MESSENGER–RNS AUS HUNDE–PANKREAS: VERHALTEN BEI DER TRANSLATION IM ZELLFREIEN SYSTEM UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER INSULIN–IMMUNOREAKTIVITÄT DER TRANSLATIONSPRODUKTE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard–Karls–Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Weidle
aus Ittelsburg

1978

MESSENGER-RNS AUS HUNDE-PANKREAS: VERHALTEN BEI DER TRANSLATION IM ZELLFREIEN SYSTEM UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER INSULIN-IMMUNOREAKTIVITÄT DER TRANSLATIONSPRODUKTE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Ulrich Weidle
aus Ittelsburg

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 1978

Dekan: Professor Dr. W. Zeil
1. Berichterstatter: Professor Dr. U. Weber
2. Berichterstatter: Universitäts-Dozent Dr. K. Eisele

Gedruckt bei Fa. H.–J. Köhler, Reprografischer Betrieb, Neue Straße 11, 7400 Tübingen

Ich danke Prof. U. Weber für die stete Unterstützung dieser Arbeit, Prof. H. Probst, Prof. U. Weser und Prof. D. Mecke für die Benutzung von Geräten in ihren Laboratorien.
Ich danke Dr. A. Jung für seine Hilfe bei den Tier-Experimenten und R. Koch für die Überlassung von ^{125}I-Insulin.
Dr. M. Beato danke ich für einen Besuch in seinem Laboratorium. Mein besonderer Dank gilt Dr. R. D. Andersen für viele stimulierende Diskussionen und gute Ratschläge.

Inhaltsübersicht

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methoden	3
2.1.	Vorbemerkung	3
2.2.	Gesamt-Nucleinsäure Extraktion und deren Charakterisierung im Rohrzucker-Gradienten	3
2.3.	Isolierung von Polysomen aus Hunde-Pankreas und deren Auftrennung in diskrete Unter-Klassen	4
2.4.	Isolierung von messenger RNS	5
2.4.1.	Aus Gesamt-Nucleinsäuren	5
2.4.2.	Aus pelletierten Gesamt-Ribosomen	5
2.4.3.	Aus diskreten Klassen von Ribosomen	6
2.5.	Zell-freie Translation von messenger RNS	6
2.5.1.	Isolierung von S-30	6
2.5.2.	Translations-System	7
2.5.3.	Bestimmung der in Protein eingebauten Radioaktivität	7
2.6.	Der doppelte Antikörper-Test zur Bestimmung der Insulin-Immunoreaktivität von Translations-Produkten	8
2.7.	Gelelektrophorese nach Laemmli	9
2.7.1.	Experimentelle Details	9
2.7.2.	Elektrophorese von Translations-Produkten	10
2.7.3.	Elektrophorese von Immunopräzipitaten	10
2.7.4.	Eichproteine	
2.8.	Antikörper	
2.8.1.	Herstellung von Antikörpern gegen Rinder-Proinsulin in Meerschweinchen	11

		Seite
2.8.2.	Immobilisierung der Antikörper an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B	12
2.9.	Affinitäts-Chromatographie von Polysomen an Antikörper- (Pro-) Insulin-Sepharose Säulen	12
3.	Ergebnisse	14
3.1.	Eignung spezies-verschiedener Pankreata zur Gewinnung intakter messenger RNS	14
3.2.	Translation von messenger RNS aus Hunde-Pankreas im zell-freien System	16
3.2.1.	Optimierung des Systems nach verschiedenen Parametern	16
3.2.2.	Abhängigkeit der Größenverteilung der Molekular-Gewichte von Translations-Produkten von der Magnesium und Kalium-Konzentration	18
3.3.	Doppelter Antikörper-Test zur Bestimmung der Insulin-Immunoreaktivität von Translations-Produkten	21
3.4.	Messenger RNS aus Hunde-Pankreas: Isolierung, Charakterisierung, zell-freie Translation und Insulin-Immuno-Reaktivität der Translations-Produkte	22
3.4.1.	Isolierung von Polysomen aus Hunde-Pankreas und ihre Charakterisierung	22
3.4.2.	Charakterisierung von messenger RNS aus Polysomen durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation	24
3.4.3.	Untersuchung der Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen von Hunde-Pankreas	27

		Seite
3.4.4.	Gel-Elektrophorese von Immunopräzipitaten der Translations-Produkte von m-RNS mit verschiedenen S-Werten	29
3.4.5.	Isolierung und zell-freie Translation von m-RNS aus diskreten Ribosomen-Klassen	32
3.4.6.	Translations-Produkte von m-RNS aus diskreten n-Somen	36
3.4.7.	Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten der Translations-Produkte von m-RNS aus diskreten n-Somen	38
3.5.	Versuche zur Isolierung von Präproinsulin messenger RNS durch Immunoreaktion von Polysomen mit immobilisierten Antikörpern	41
3.5.1.	Prinzip der Methode und Verhalten der immobilisierten Antikörper gegenüber ^{125}I-Insulin	41
3.5.2.	Immunoreaktion von Polysomen aus Hunde-Pankreas mit immobilisierten Antikörpern gegen Rinder-Insulin und Rinder-Proinsulin	44
4.	Diskussion	51
5.	Zusammenfassung	60
6.	Literaturverzeichnis	61

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536511_0027

In dieser Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

RNS	: Ribonucleinsäure
m-RNS	: Messenger Ribonucleinsäure
fl. N_2	: flüssiger Stickstoff
EU	: Extinktionseinheit $\left[E_{260}^{1\ cm} \times ml\right]$
TCA	: Trichloressigsäure
SDS	: Natrium-Dodecylsulfat
Oligo-dT-Cellulose	: Oligo-Desoxythymidylat-Cellulose
t-RNS	: Transfer Ribonucleinsäure
S-30	: 30.000 g Überstand
HEPES	: N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthan-sulfonsäure
DTE	: 1.4 Dithioerythrit
CPK	: Creatin-Kinase
CP_i	: Creatin-Phosphat
ATP	: Adenosintriphosphat
GTP	: Guanosintriphosphat
PEG	: Polyäthylenglykol
APS	: Ammoniumperoxodisulfat
BIS	: N,N'-Methylenbisacrylamid
TEMED	: N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
EDTA	: Äthylendiamintetraessigsäure, Tri-Na-Salz
PPO	: 2,5-Diphenyloxazol
POPOP	: 2,2'-p-Phenylen-bis-(5-Phenyloxazol)
rpm, Upm	: Umdrehungen pro Minute
cpm, Ipm	: Impulse pro Minute
TRIS	: [Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan]

1. EINLEITUNG

Eine Reihe von Laboratorien (1-10) berichtete im Laufe der letzten zwei Jahre über die Identifizierung von Präproinsulin (PPI) als in vitro Translations-Produkt von messenger RNS aus Pankreas-Gewebe. Die meisten Autoren benutzten für ihre Untersuchungen endokrines Gewebe, in dem die messenger RNS für Präproinsulin beträchtlich angereichert ist. Langerhanssche Inseln aus Ratten-Pankreas (4), chemisch oder radiologisch induzierte Insulinome der B-Zellen (5,6), oder Brockmannsche Körperchen bei Fischen (7-10), fungierten als bevorzugte Ausgangs-Materialien für die Extraktion von messenger RNS.
Im Rahmen der hier vorgelegten Untersuchungen wurden die Nucleinsäuren aus Gesamt-Pankreas isoliert. Wegen des geringen Ribonuclease-Gehaltes (1,11) fiel die Wahl auf Hunde-Pankreas. Es sollte versucht werden, unter den Translations-Produkten pankreatischer m-RNS Präproinsulin nachzuweisen, eine Komponente also, die sicherlich nur sehr schwach angereichert ist, da der endokrine Anteil nur etwa 1% des Pankreas-Gewebes ausmacht (1).
Dazu sollte nach Methoden der Literatur (12) gewonnene messenger RNS im zell-freien System mit Ribosomen aus Weizen-Keimen (13,14) auf ihre Translatierbarkeit untersucht werden. Da im voraus klar war, daß die Präproinsulin Moleküle nur eine sehr kleine Teilmenge der in vitro Translations-Produkte darstellten, mußte zu deren definitivem Nachweis ein effizientes, nach allen Parametern optimiertes zell-freies System entwickelt werden.
Für die Diskriminierung zwischen insulin-immunoreaktiven und nicht insulin-immunoreaktiven Translations-Produkten bot sich ein in (1) entwickelter doppelter Antikörper-Test an.
Mit den so gewonnenen Daten sollten Aussagen über das Sedimentations-Verhalten von Präproinsulin-messenger RNS im Rohrzucker-Gradienten und über die Biosynthese von

Präproinsulin auf einer eventuell diskreten Klasse von Ribosomen gewonnen werden.
Schließlich sollte durch Antigen-Antikörper Reaktion von Polysomen mit immobilisierten Insulin-Antikörpern der Versuch unternommen werden, die Ribosomen mit insulin-immunoreaktiven Proteinen zu selektieren und damit die messenger RNS für Präproinsulin erheblich anzureichern.
Nicht zuletzt sollten diese Untersuchungen ein Modell für die künftige Isolierung und Charakterisierung von Translations-Produkten oder m-RNA Molekülen darstellen, bei denen von ähnlich ungünstigen Anreicherungsbedingungen ausgegangen werden muß.
Eine eventuell erfolgreiche Reinigung (oder erhebliche Anreicherung) der m-RNS für Präproinsulin würde die Synthese eines komplementären DNA-Stranges mit reverser Transkriptase ermöglichen. Diese komplementäre DNA könnte durch Hybridisierungs-Versuche zur Quantifizierung der m-RNS für Präproinsulin bei verschiedenen Stoffwechsel-Situationen verwendet werden und damit Einblicke in die Regulation der Insulin-Biosynthese auf der Ebene der Transkription gewähren.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1.

Vorbermerkung

Die bei der Isolierung von Gesamt-Nucleinsäuren, Polysomen und messenger RNS verwendeten Lösungen und Glas-Geräte wurden unmittelbar vor dem Versuch autoklaviert, die Stamm-Lösungen des Translations-Systems mit sterilem, bidestillierten Wasser angesetzt.

2.2.

Gesamt-Nucleinsäure-Extraktion und deren Charakterisierung im Rohrzucker-Gradienten

Die Hunde wurden von der Fa. E. Stock, Gelnhausen, bezogen, durch Applikation von 0.5 g Evipan^{R} (Behring-Werke, Marburg) narkotisiert, das Pankreas chirurgisch entnommen und sofort in fl. N_2 eingefroren. Rinder-Pankreas wurde im Schlachthof gesammelt, Ratten- und Kaninchen-Pankreas Laboratoriums-Tieren des hiesigen Instituts entnommen. Die Pankreata wurden sofort nach Entnahme in fl. N_2 eingefroren und anschließend in einem Mörser mit flüssigem N_2 pulverisiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit Modifikationen nach (1). Das pulverisierte Gewebe (50-70g) wird mit 700 ml 0.2 M Tris, pH 8,8, 25 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1% SDS und 350 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol = 50/48/2 versetzt, 30 Minuten geschüttelt und die Phasen im JA 14 Rotor (15 Minuten, 14 000 rpm) getrennt. Die wässrige Phase wird abgenommen und erneut phenolisiert. Dieser Vorgang wird zwei Mal wiederholt. Die letztlich erhaltene wässrige Phase wird mit LiCl auf 0.2 M eingestellt und durch Zugabe von 2 Volumen Äthanol bei -20° C über Nacht präzipitiert.
Die analytische Untersuchung der Präparationen erfolgte durch Zentrifugation in 5 - 20% linearen Sucrose-Gradienten (MAN-Sucrose) in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,4, im SW 27, 4° C, 25 000 rpm, 15 h. Es wurden am ISCO Fraktionator Proben zu 1,2 ml aufgefangen und die EU^{260} gemessen.

2.3.

Isolierung von Polysomen aus Hunde-Pankreas und deren Auftrennung in diskrete Unter-Klassen

Die Isolierung erfolgte mit Modifikationen nach Beato (15,16). Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt. 30-40 g Hunde-Pankreas werden nach Entnahme aus dem Spender-Tier in 80 ml 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.25 M Sucrose, 25 mM NaCl, 500 µg/ml Heparin gegeben und mit der Schere fein zerschnitten. Die Zellen werden durch fünf Schläge mit einem Teflon-Homogenisator aufgebrochen und das Homogenisat 10 Minuten bei 30 000 g im JA 20 zentrifugiert. Die auf dem Überstand schwimmende Fettschicht wird mit einem sterilen Glasstab abgenommen, der Überstand abpipettiert und mit Triton X 100 und Natrium-Deoxycholat (Serva) auf jeweils 1% eingestellt. Mit der klaren Lösung überschichtet man vorsichtig einen in einem SW 27-Röhrchen (Polyallomer) vorbereiteten Stufen-Gradienten. Dazu wurden 8 ml 2.0 M Sucrose (MAN) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 µg/ml Heparin mit 13 ml 0.5 M Sucrose im selben Puffer überschichtet. Man zentrifugiert im Ti 60, 5 Stunden, 40 000 rpm, 4° C. Nach Abnahme des Überstandes erhält man die Polysomen als farbloses Pellet. Sie werden zu etwa 150 EU^{260}/ml in sterilem Wasser gelöst und in fl. N_2 eingefroren.

Die analytische Charakterisierung der Polysomen erfolgte durch Zentrifugation im SW 40, 40.000 rpm, 2 Stunden, 4° C, durch 0.5 - 1.5 M Sucrose in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 50 µg/ml Heparin. Es werden bis zu 20 EU^{260} Polysomen aufgetragen, nach dem Lauf Fraktionen zu 0.3 ml aufgefangen und die Gradienten bei 254 nm mit einem ISCO-Absorptions-Monitor gescannt.

Für die präparative Isolierung von bestimmten Ribosomen-Klassen wird bei unverändertem Gradienten im SW 27 bei 25.000 rpm, 4° C, 5 Stunden, zentrifugiert. Es werden Fraktionen zu 1.2 ml aufgefangen und ebenfalls bei 254 nm gescannt. Es werden bis zu 75 EU^{260} pro Gradient aufgetragen.

2.4.
Isolierung von messenger RNS

2.4.1.
Aus Gesamt-Nucleinsäuren (12)
Es wurde eine mit einem Gramm Oligo-dT-Cellulose T 2 (Collaborative Research) gefüllte Affinitäts-Säule verwendet. Das vakuum-getrocknete Nucleinsäure-Pellet wird in 10 mM TRIS, pH 7.4, 0.5 M KCl, gelöst, die Konzentration auf etwa 20 EU^{260}/ml eingestellt und auf die äquilibrierte Säule appliziert. Nach Waschen mit mindestens 20 Säulen-Volumen Äquilibrier-Puffer eluiert man mit 10 mM TRIS, pH 7.4 und fängt Fraktionen zu je 1 ml auf. Die Peak-Fraktionen werden gepoolt, mit LiCl auf 0.1 M eingestellt, wenn nötig mit 20 µg/ml E.coli t-RNS (Boehringer) supplementiert und mit zwei Volumen Äthanol bei -20° C über Nacht präzipitiert. Zur Beseitigung des ribosomalen Anteils wird rechromatographiert.

2.4.2.
Aus pelletierten Gesamt-Ribosomen (17,18)
Die Polysomen werden in 10 mM TRIS, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS, gelöst, auf eine Konzentration von 20 EU^{260} eingestellt und auf Oligo-dT-Cellulose aufgetragen. Man wäscht mit 20 Säulen-Volumen 10 mM TRIS, 0.5 M NaCl, 0.5 % SDS, pH 7.4, anschließend mit 10 mM TRIS, pH 7.4, 0.5 M NaCl und eluiert mit bidest. Wasser. Die weiteren Schritte werden wie in (2.4.1.) beschrieben, ausgeführt. Das Pellet wird in bidest. Wasser gelöst und Aliquote in fl. N_2 eingefroren.
Zur weiteren Fraktionierung zentrifugiert man durch 5-20% Sucrose, 10 mM TRIS, pH 7.4, 1 mM EDTA, im SW 27, 4° C, 25 000 rpm, 30 Stunden. Dabei wurden die Nucleinsäuren vor dem Auftragen drei Minuten auf 70° C erwärmt und anschließend in Eis abgekühlt. Es werden Fraktionen zu 1.2 ml aufgefangen und die Gradienten bei 254 nm gescannt. Die Fraktionen werden mit LiCl auf 0.1 M eingestellt, mit 15 µg E.coli t-RNS supplementiert und mit zwei Volumen Äthanol bei -20° C über Nacht präzipitiert.

Die Pellets werden drei mal mit Äthanol gewaschen, vakuumgetrocknet, jeweils in 50 µl bidest. Wasser gelöst und in fl. N_2 eingefroren. Pro Gradient werden bis zu 8 EU^{260} aufgetragen.

2.4.3.

Aus diskreten Klassen von Ribosomen

Nach (2.3.) zentrifugierte Polysomen konnten im Rohrzucker-Gradienten in Mono- bis Pentasomen aufgelöst werden. Die entsprechenden Fraktionen werden gepoolt, durch Zugabe von SDS auf 0.5% und NaCl auf 0.5 M eingestellt und wie in (2.4.2.) beschrieben an Oligo-dT-Cellulose chromatographiert. Die pelletierten Nucleinsäuren werden in 50 µl bidest. Wasser gelöst und in fl. N_2 eingefroren.

2.5.

Zell-freie Translation von messenger RNS

2.5.1.

Isolierung von S-30

Die Präparation erfolgte mit Modifikationen nach (14). Es wurden Weizen-Keime von Old Stone Mill verwendet (Geschenk von Dr. R.D. Andersen).

5 g Weizen-Keime werden mit 5 g sterilem Glas-Pulver in einem vorgekühlten Mörser 60 Sekunden lang zerrieben. Man homogenisiert 30 Sekunden lang mit 20 mM HEPES, 1 mM DTE, 1 mM $MgAc.4H_2O$, 2 mM $CaCl_2.H_2O$, 100 mM KCl, pH 7.6 (mit KOH titriert), transferiert in ein steriles 15 ml Corex-Röhrchen und zentrifugiert im JA 20 bei 16.000 rpm (30 000g) bei 4° C 10 Minuten lang. Der Überstand (ohne Fettschicht) wird mit entsprechend konzentrierten Stamm-Lösungen eingestellt auf folgende Konzentrationen: ATP 1 mM, GTP 200 µM, DTE 2 mM, CP_i 7.5 mM, CPK 40 µg/ml, Mg^{2+} 2.5 mM. Man präinkubiert bei 30° C 20 Minuten. Die Mischung wird auf eine mit 20 mM HEPES, pH 7.6, 120 mM KCl, 5 mM $MgAc.4H_2O$, 1 mM DTE äquilibrierte Sephadex G 25 (coarse) Säule aufgetragen (30x1cm), die Fraktionen mit der größten Trübung gesammelt und im JA 20 bei 16000 rpm, 4° C, 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird zu Aliquoten in fl. N_2 eingefroren.

2.5.2.

Translations-System

ATP, GTP, CP_i und CPK (Lyophilisat aus Kaninchenmuskel) wurden von Boehringer/Mannheim, HEPES und PEG 6000 von SERVA, Heidelberg und ^{3}H-Leucin (40-60 Ci/mmol) von Amersham/Buchler, Braunschweig, bezogen.

Die Translation von messenger RNS wurde in Anlehnung an (13,14) durchgeführt. Die Reaktionen liefen in einem Volumen von 50 µl in autoklavierten 1 ml Eppendorf-Reaktions-Gefäßen ab.

Zusammensetzung des Systems: ATP 1.5 mM, GTP 30 µM, CP_i 16.5 mM, CPK 400 µg/ml, DTE 3 mM, HEPES 15 mM, 19 Aminosäuren (ohne Leucin) 120 µM (jede), 10 µl S-30, 5 µCi ^{3}H-Leucin, 3 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 4 mM PEG, 2-5 µg m-RNA, pH 7.6. Es wird 60 Minuten bei 25° C inkubiert. Nach der Inkubation behandelt man jeden Ansatz 30 Minuten mit 2 µg Ribonuclease A (Boehringer) bei Raumtemperatur.

Wenn nicht ausdrücklich angegeben, hatten alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Translations-Ansätze obige Zusammensetzung.

2.5.3.

Bestimmung der in Protein eingebauten Radioaktivität

Ein Aliquot des Translations-Ansatzes (5µl) wird auf Whatman 3 MM Papier aufgetüpfelt, getrocknet, zwei Mal 10 Minuten mit eiskalter 5% iger TCA behandelt, 15 Minuten in 5% iger TCA auf 90° C erhitzt, zwei Mal mit Äthanol und zwei Mal mit Äther gewaschen und getrocknet. Die Filter werden in 10 ml Szintillator (5g PPO, 0.1 g POPOP ad ein Liter Toluol) eingelegt und in einem Packard Tri-Carb Spectrometer 2450 ausgezählt.

2.6.

Der doppelte Antikörper-Test zur Bestimmung der Insulin-Immunoreaktivität von Translations-Produkten (1)

Antikörper gegen Rinder-Insulin (hergestellt in Meerschweinchen), wurden von MILES bezogen und mit 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 1% Natrium-Deoxycholat, 1% Triton X 100 und 50 µM Leucin (=Puffer T) 1:50 verdünnt und Aliquote zu 1 ml bei -20° C aufbewahrt. Diese Verdünnung wird als Lösung A bezeichnet.

Antiserum gegen die Immunoglobulin-Fraktion von Meerschweinchen (hergestellt in Ziegen) wurde ebenfalls von MILES bezogen, mit 2x Puffer T 1:1 verdünnt und Aliquote von 1 ml bei -20° C aufbewahrt. Diese Verdünnung wird als Lösung B bezeichnet.

Es werden zunächst identische Immunopräzipitate vorgegeben. Dazu werden 50 µl A und 20 µl B zwei Stunden bei 37° C inkubiert. Ein paralleler Ansatz enthält zusätzlich 10 µg Rinder-Insulin (Sigma) als Competitor. (In Vorversuchen mit ^{125}I-Insulin als Tracer war ermittelt worden, daß 50 µl A durch 20 µl B quantitativ präzipitiert werden).

Die inzwischen mit Ribonuclease A behandelten Translations-Produkte (50 µl) werden mit 50 µl 2x Puffer T versetzt und 15 Minuten in der Microfuge (Eppendorf) bei 4° C zentrifugiert. Die Überstände werden gesammelt.

Zu den Immunopräzipitaten (mit und ohne 10 µg Insulin als Competitor) werden gleich viele cpm TCA-fällbare Translations-Produkte gegeben und mindestens 48 Stunden bei 4° C inkubiert. In anderen Versuchen wurden die Immunopräzipitate mit ^{125}I-Insulin unter denselben Bedingungen inkubiert.

Die Ansätze werden dann mit 1 M Sucrose in Puffer T unterschichtet, in der Microfuge zentrifugiert und mindestens fünf Mal mit je 1 ml Puffer T gewaschen. Die so erhaltenen Immunopräzipitate werden über P_2O_5 vakuum-getrocknet.

Für die weitere Untersuchung standen zwei Methoden zur Verfügung:

a) Die Immunopräzipitate werden unter Schütteln über Nacht bei 37° C mit 1 ml Protosol (NEN) : Toluol = 1:1 inkubiert

und in 10 ml Toluol-Szintillator ausgezählt. Die Differenz der cpm der Präzipitate ohne und mit Competition wird als Insulin-Immunoreaktive-Radioaktivität definiert. Bezieht man diese Differenz auf die insgesamt eingesetzten cpm, kann man aussagen, wieviel Prozent der Translations-Produkte insulin-immunoreaktiv sind.
b) Die Immunopräzipitate werden gelelektrophoretisch untersucht (siehe nächster Abschnitt).

2.7.
Gelelektrophorese nach Laemmli (19)

2.7.1.
Experimentelle Details
In dieser Arbeit wurden ausschließlich 20% ige Polyacrylamid-Gele als Trenn-Gele verwendet. Alle Reagenzien für die Gel-Elektrophorese wurden von Serva bezogen.
Trenngel. Zum Gießen der Gele wird eine Stamm-Lösung mit folgenden Reagenzien verwendet: 30 ml 40 %iges Acrylamid + 1.069% BIS, 15 ml 1.5 M TRIS, 0.4% SDS, pH 8.8, 15 ml APS (40 mg/100 ml), 200 µl TEMED.
Sammelgel. Folgende Stamm-Lösung wird zum Gießen des Gels verwendet: 2.3 ml 40%iges Acrylamid + 1.069% BIS, 7.5 ml 0.5 M TRIS, 0.4% SDS, pH 6.8, 7.5 ml APS (100 mg/100 ml), 200 µl TEMED, 12.6 ml bidest. Wasser.
Es wurden Röhrchen-Gele (12x0.6 cm) gegossen, pro Röhrchen eine Stromstärke von 3 mA angelegt und vier bis fünf Stunden elektrophoretisiert.
Waren die aufgetragenen Produkte radioaktiv markiert, wurden die Gele nach dem Lauf in eine definierte Anzahl von Scheibchen mit einem Gel-Schneider geschnitten. Die Scheibchen wurden bei 37° C mit je 1 ml 30% igem H_2O_2 über Nacht unter Schütteln inkubiert und mit Toluol-Triton-Szintillator (350 ml Triton X100 + 650 ml Toluol-Szintillator) ausgezählt.

2.7.2.

Elektrophorese von Translations-Produkten

Zu den Translations-Produkten (50 µl) werden 10 µl 20 mM Leucin und 45 µl 1 M TRIS pipettiert und 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach Zugabe von 23 µl 0.5 M Essigsäure versetzt man mit 75 µl 2 M TRIS-HCl, pH 8.2 und 5 µl 1 M DTE. Durch Einwiegen von 0.2 g Guanidium-chlorid pro Röhrchen stellt man auf 6 M ein und inkubiert eine Stunde bei 37° C.
Während die Inkubation läuft, löst man drei Mal mit Petrol-Äther umkristallisierte Jodessigsäure (186 mg) in 1 ml 1 M NaOH.
Davon pipettiert man 50 µl in jedes Röhrchen und inkubiert 30 Minuten bei Raum-Temperatur im Dunkeln. Man stoppt mit 25 µl 1 M DTE und inkubiert 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Man dialysiert anschließend in vorher mit EDTA ausgekochten Dialyseschläuchen bei 4° C gegen 5 mM TRIS-HCl, pH 7.4, zentrifugiert die Dialysate in der Microfuge ab und dampft die Überstände im Vakuum zur Trockene ein. Man löst mit 50 µl 0.0625 M TRIS-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2-Mercaptoäthanol, 0.001% Bromphenol-Blau (=Proben-Puffer) und elektrophoretisiert.
In einigen wenigen Fällen wurden die Translations-Produkte mit vier Volumen Aceton über Nacht bei -20° C ausgefällt, in Proben-Puffer gelöst und elektrophoretisiert.

2.7.3.

Elektrophorese von Immunopräzipitaten

Die Immunopräzipitate wurden nach dem Waschen vakuum-getrocknet, über Nacht bei 37° C mit 50 µl Proben-Puffer inkubiert und elektrophoretisiert.

2.7.4.

Eichproteine

Sie werden angefärbt (19) und die Beweglichkeit nach (20) ermittelt.
Es wurden verwendet: BSA (MG 68 000), Ovalbumin (MG 46 000),

Chymotrypsinogen (MG 26 000), Ribonuclease (MG 14 000), Cytochrom c (MG 12 000), Insulin (MG 6 000), Insulin B-Kette (MG 3500), Insulin A-Kette (MG 2500).

2.8.
Antikörper

2.8.1.
Herstellung von Antikörpern gegen Rinder-Proinsulin in Meerschweinchen

2 mg Rinder-Proinsulin (Novo) werden in 2 ml 0.9% iger NaCl gelöst (=Antigen).
50 µg Antigen, 450 µl 0.9% ige NaCl und 500 µl komplettes Freundsches Adjuvans (Behring-Werke, Marburg) werden durch Hin- und Herziehen zwischen zwei mit einer engen Kanüle verbundenen Spritzen emulgiert.
Diese Emulsion wird einem Meerschweinchen auf vier verschiedene Stellen verteilt in die Hinterschenkel injiziert. Ein weiteres Versuchs-Tier wird gleich behandelt, zwei andere fungieren als Kontrollen. Nach einer Woche appliziert man 50 µg Antigen pro Tier in die Bein- und Nackenmuskulatur. Im Abstand von jeweils vier Wochen wird mit 300 bzw. 400 µg Antigen geboostert.
Den Tieren wird das Blut durch Herzpunktion oder Entbluten entnommen (auch den Kontrollen). Man läßt über Nacht bei 4° C stehen und trennt das Serum vom Blutkuchen durch Zentrifugation ab. Die Antikörper werden wie in (21) beschrieben mit $(NH_4)_2SO_4$ aus dem Serum ausgefällt. Nach derselben Vorschrift wird eine Kontroll-Immunoglobulin-Fraktion isoliert.
Die Präzipitate werden in 0.01 M Natrium-Phosphat-Puffer, 0.015 M NaCl, pH 7.2, gelöst und die Ribonucleasen nach (22) an einer Säule aus DEAE-Cellulose und CM-Cellulose abgetrennt. Man fällt durch Einstellen einer Sättigung von 40% mit $(NH_4)_2SO_4$ erneut aus und löst die Präzipitate in je 20 ml 0.1 M $NaHCO_3$, 0.5 M NaCl, pH 8.3. Antikörper- und Kontroll-Präparationen werden im Kühlschrank aufbewahrt. Die Antikörper werden unter "Ergebnisse" charakterisiert.

2.8.2.

Immobilisierung der Antikörper an Bromcyan-aktivierte Sepharose 4 B

Nach (23) werden folgende Präparationen immobilisiert:

a) Meerschweinchen Kontroll-Immunoglobulin-Fraktion
b) Antikörper gegen Rinder-Insulin, hergestellt in Meerschweinchen (Miles)
c) Meerschweinchen Antikörper gegen Rinder-Proinsulin (2.8.1.)

Die so präparierten Affinitäts-Säulen hatten ein Bettvolumen von 10 ml. Als Indikator für die erfolgte Kopplung diente die Bindung von ^{125}I-Insulin.

2.9.

Affinitäts-Chromatographie von Polysomen an Antikörper-(Pro-)Insulin-Sepharose Säulen

100 EU^{260} Polysomen werden über Nacht bei 4° C im Bettvolumen der Affinitäts-Säulen inkubiert. Man wäscht anschließend mit etwa 50 Säulen-Volumen Äquilibrier-Puffer (= 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 0.14 M NaCl). Die Polysomen ohne Affinität werden bei -20° C über Nacht präzipitiert, in 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS, gelöst und die m-RNS nach (2.4.2.) isoliert. Die ausgefällte m-RNS wird in 50 µl sterilem, bidest. Wasser gelöst und in fl. N_2 eingefroren.

Die Polysomen mit Affinität werden mit 20 ml 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS, eluiert. Das Eluat wird auf Oligo-dT-Cellulose aufgetragen und die m-RNS nach (2.4.2.) abgetrennt. Die pelletierte m-RNS wird in 50 µl sterilem, bidest. Wasser gelöst und in fl. N_2 eingefroren.

Die m-RNS aus Polysomen ohne und mit Affinität zum Säulenmaterial werden nach (2.5.) im zell-freien System übersetzt. Die Translations-Produkte werden auf Insulin-Immunoreaktivität (2.7.) und bezüglich ihrer Molekular-Gewichts-Verteilung untersucht.

Prüft man das Bindungs-Verhalten der Affinitäts-Säulen für

^{125}I-Insulin, inkubiert man ebenfalls bei 4° C über Nacht im Bettvolumen. Man wäscht mit mindestens 50 Säulenvolumen Äquilibrier-Puffer (= 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7.4, 0.14 M NaCl, 1% Triton X100, 1% Deoxycholat) und eluiert mit 10 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.5% SDS. Man fängt Fraktionen zu 1.5 ml auf, welche in einem Gamma Spektrometer (Packard), Modell 5019, ausgezählt werden.

3. ERGEBNISSE

3.1.
Eignung spezies-verschiedener Pankreata zur Gewinnung intakter messenger RNS

Nach (2.2.) wurden Gesamt-Nucleinsäure-Präparationen aus den Geweben gewonnen. Durch isopyknische Gradienten-Zentrifugation wurde der DNS-Gehalt der Präparationen zu 6-9% bestimmt (Daten werden hier nicht gezeigt).
Als Indikator für die Intaktheit der Präparationen diente ihr Sedimentations-Verhalten im Rohrzucker-Gradienten.
Da messenger RNS ebenso wie ribosomale RNS durch Ribonucleasen fragmentiert wird, sollte man beim Auftreten der für eukaryotische, ribosomale RNS charakteristischen Sedimentations-Banden bei 5S, 18S und 28S auf die Integrität der mit-extrahierten messenger RNS schließen können.
Abbildung 1 zeigt, daß der Abbaugrad der Präparationen spezies-abhängig ist. Bei adultem Rinder-Pankreas ist die Fragmentierung extrem stark (1C), bei Ratten-Pankreas noch so stark, daß die diskreten Sedimentations-Spezies nicht zu erkennen sind (1A). Die Präparationen aus Kaninchen-Pankreas (1B) und aus Hunde-Pankreas (1D) zeigen ebenso wie eine Kontroll-Präparation aus Ratten-Leber das für nicht abgebaute Nucleinsäuren charakteristische Sedimentations-Verhalten.
Die unter (1A) und (1C) aufgetretenen Fragmentierungen wurden nicht durch exogene Ribonucleasen verursacht, da einerseits steril gearbeitet wurde und andererseits das Sedimentations-Verhalten in mehreren, unabhängigen Experimenten reproduziert werden konnte.
Die in den folgenden Experimenten beschriebene m-RNS wurde aus Hunde-Pankreas isoliert.

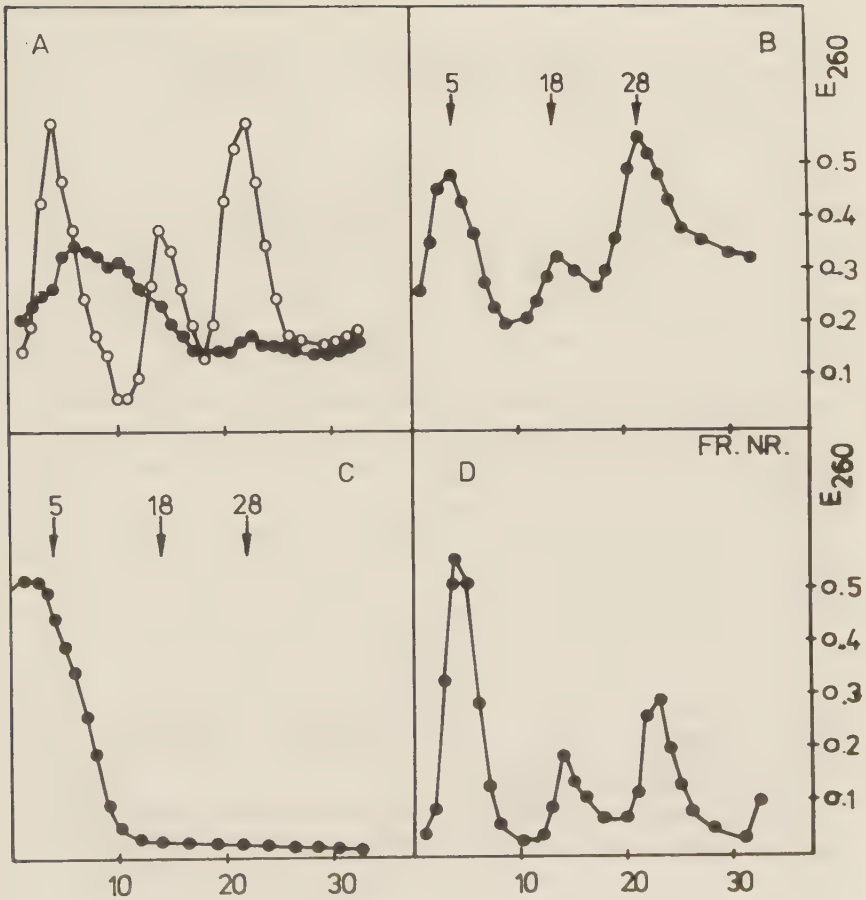

Abb. 1: Sucrose-Gradientenzentrifugation von Gesamt-Nucleinsäure-Präparationen aus Rattenleber (o—o) und Ratten-Pankreas (●—●) in (1A), Kaninchen-Pankreas in (1B), adultem Rinder-Pankreas (1C) und Hunde-Pankreas (1D). Die Pfeile bezeichnen die S-Werte in den betreffenden Fraktionen. Präparations- und Zentrifugations-Bedingungen (2.2.).

3.2.

Translation von messenger RNS aus Hunde-Pankreas im zell-freien System

3.2.1.

Optimierung des Systems nach verschiedenen Parametern

Hunde Proinsulin enthält 10 Leucin-Reste, die sich auf die A-Kette (2Leu), die B-Kette (3Leu) und das C-Peptid (5Leu) verteilen (24,25). Außerdem wurde in allen bisher bekannten Prä-Peptiden von sekretorischen Proteinen eine hohe Dichte von Leucin-Resten ermittelt (26-30). In den Prä-Anteilen der Präproinsulin-Moleküle von Rind und Ratte sind jeweils sieben Leucin-Reste vorhanden (3,4). Deshalb wurde als zu inkorporiende, radioaktiv-markierte Aminosäure ^{3}H-Leucin (40-60 Ci/mmol) gewählt.

In der Abbildung 2 sind Optimierungs-Versuche des zell-freien Translations-Systems nach einigen Parametern dargestellt.

Das System ist stark Magnesium-sensitiv (2A). Bei 3 mM Mg^{2+} liegt ein scharfes Optimum. Bei 100 mM K^{+} ist die in TCA-fällbares Protein inkorporierte Radioaktivität maximal (2B). Polyäthylenglycol (PEG) verdoppelt die ^{3}H-Leucin Inkorporation im Bereich zwischen 1 und 4 mM (2C). Spermin stimuliert kontinuierlich bis zu einer Konzentration von 60 µM (2D). Das System inkorporiert bis zu 60 Minuten (2E). Bei weiterer Inkubation verringert sich die TCA-fällbare Radioaktivität.

In den hier dargestellten Experimenten ist die Stimulierung der ^{3}H-Leucin Inkorporation gegenüber der endogenen Synthese des Systems unter optimalen Bedingungen (3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^{+}, 4 mM PEG, 2 µg m-RNS) etwa 75 fach.

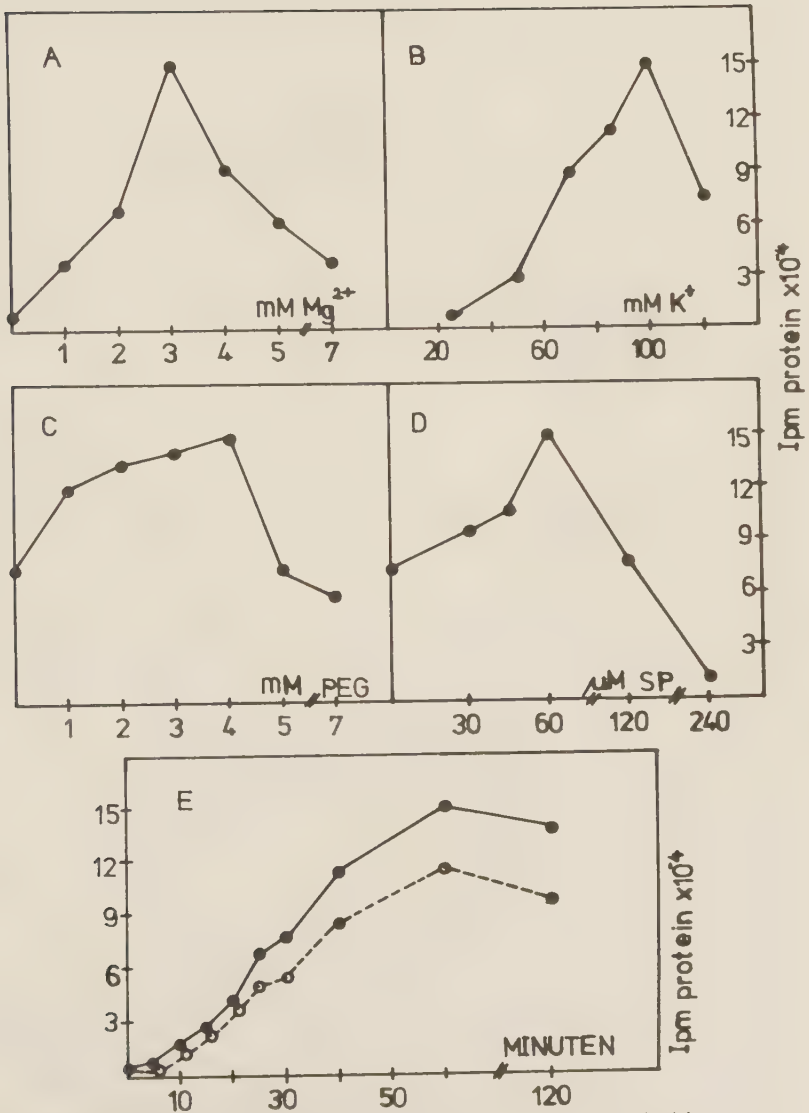

Abbildung 2: Optimierung des zell-freien Translations-Systems. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb. 2: Optimierung des zell-freien Translations-Systems. 2 µg m-RNS aus Hunde-Pankreas wurden unter variierenden Bedingungen übersetzt.
(A): 100 mM K^+, 4 mM PEG, Mg^{2+}-Konzentration als Variable
(B): 3 mM Mg^{2+}, 4 mM PEG, K^+-Konzentration wird verändert
(C): 3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^+, PEG-Konzentration wird moduliert
(D): 3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^+, ohne PEG, der Einfluß von Spermin wird untersucht
(E): Inkorporations-Kinetik von 1 µg (gestrichelte Linie) und 2 µg (ausgezogene Linie) m-RNA bei 3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^+ und 4 mM PEG.
5 µl aus 50 µl werden auf TCA-fällbare Radioaktivität untersucht. Bedingungen: (2.5.).

3.2.2.
Abhängigkeit der Größenverteilung der Molekular-Gewichte von Translations-Produkten von der Magnesium- und Kalium-Konzentration.

Zunächst sollte untersucht werden, in welchem Bereich die Molekular-Gewichte der Translations-Produkte pankreatischer m-RNS unter optimalen Bedingungen (3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^+, 4 mM PEG) gelegen sind. Abbildungen (3C) und (4B) zeigen, daß unter diesen Bedingungen im Intervall zwischen 6000 D und 50 000 D die meisten Spezies zu finden sind. Arbeitet man bei der suboptimalen Mg^{2+}-Konzentration von 1 mM, vollzieht sich eine signifikante Verschiebung zu kleineren Molekular-Gewichten hin (3A). Die Spezies liegen bevorzugt im Bereich zwischen 6000 D und 12 000 D. Bei 2 mM Mg^{2+} (3B) tritt gegenüber 1 mM Mg^{2+} (3A) eine klare Verschiebung nach höheren Molekular-Gewichten auf, die aber noch nicht so prononciert auftreten wie bei der optimalen Mg^{2+}-Konzentration 3 mM (3C). (3D) und (3E) zeigen Untersuchungen bei 4 mM Mg^{2+} und 7 mM Mg^{2+}. Bei 7 mM Mg^{2+} tritt vorzeitiger Kettenabbruch auf, die Spezies liegen bevorzugt im Intervall zwischen 6000 und 12000 D.

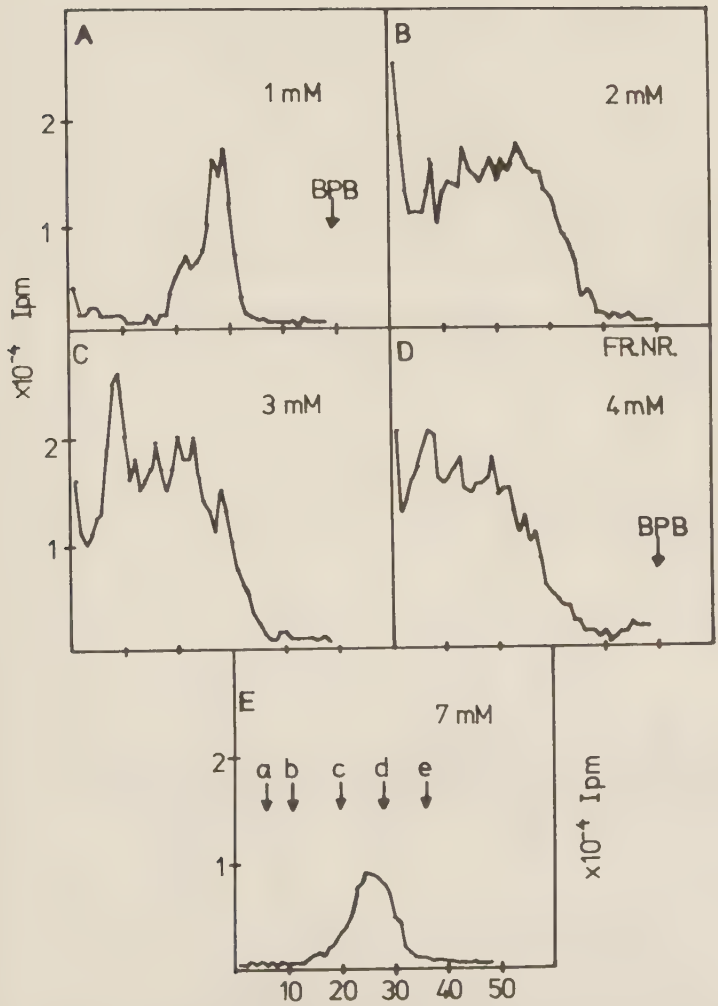

Abb. 3: Abhängigkeit der Molekular-Gewichtsverteilung von Translations-Produkten von der Magnesium-Konzentration. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abbildung 3: Verteilung der Molekular-Gewichte von Translations-Produkten bei 100 mM K^+, 4 mM PEG und variierenden Mg^{2+}-Konzentrationen.
(3A): 1 mM Mg^{2+}, (3B): 2 mM Mg^{2+}, (3C): 3 mM Mg^{2+},
(3D): 4 mM Mg^{2+}, (3E): 7 mM Mg^{2+}.
Die Translations-Produkte wurden nach (2.7.) in 20%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisiert, die Gele in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität ausgezählt. BPB = Bromphenol-Blau; a,b,c,d und e bezeichnen die Positionen von Eichproteinen.
a Ovalbumin MG 46 000, b Chymotrypsinogen MG 26 000, c Cytochrom c MG 12 000, d Insulin MG 6 000, e Insulin-A-Kette MG 2 500.

Abbildung (4A) zeigt, daß sich bei der suboptimalen K^+-Konzentration 50 mM gegenüber der optimalen K^+-Konzentration 100 mM (4B) bevorzugt niedermolekulare Fragmente ansammeln.

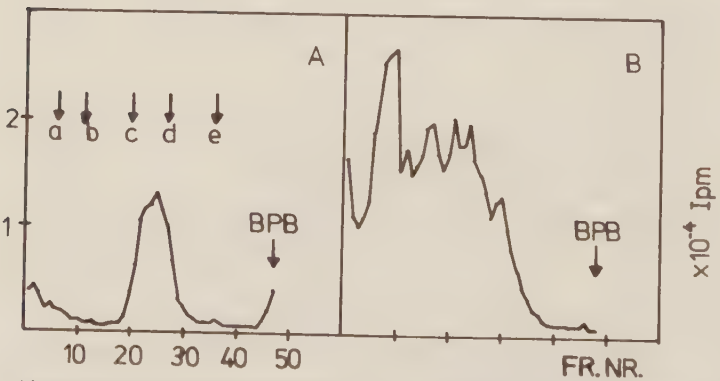

Abb.4: Gel-Elektrophorese von Translations-Produkten bei sub-optimaler und optimaler K^+-Konzentration (2.7.)
(A): 3 mM Mg^{2+}, 4 mM PEG, 50 mM K^+
(B): 3 mM Mg^{2+}, 4 mM PEG, 100 mM K^+
Die Gele werden in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität ausgezählt. a,b,c,d,e sind dieselben Eichproteine wie in Abb.3.

3.3.

Doppelter Antikörper-Test zur Bestimmung der Insulin-Immuno-Reaktivität von Translations-Produkten.

Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, daß die vorgelegten Immunopräzipitate Tracer-Insulin (^{125}I-Insulin, ^{125}I-Proinsulin, oder das Translations-Produkt Präproinsulin) binden, daß aber bei gleichzeitiger Anwesenheit eines 1000 fachen Überschusses nicht-markierten Insulins der Tracer nicht gebunden wird (3). Dies wird in Abbildung 5 gezeigt.

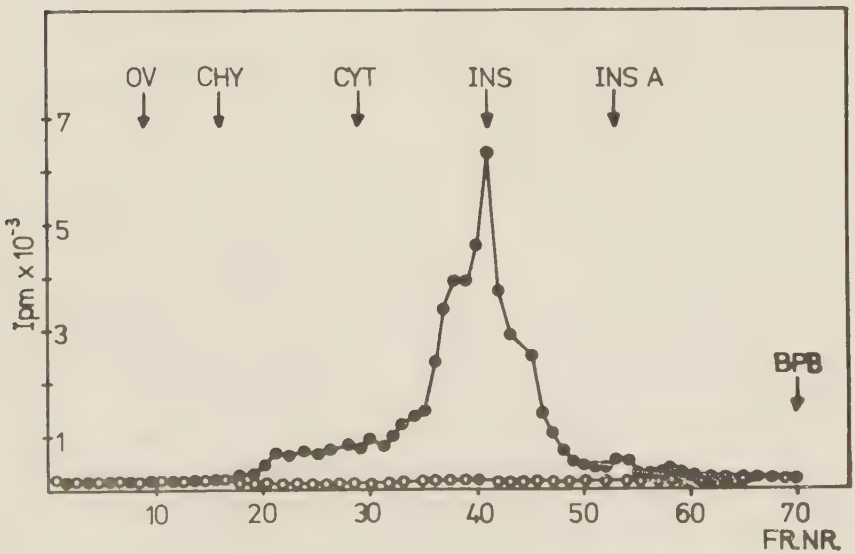

Abb.5: Immunopräzipitate (2.6.) werden mit je 10 µl ^{125}I-Insulin ohne (●—●) und mit Competition durch Insulin (o—o) über Nacht inkubiert, isoliert, gelöst und nach (2.7.) elektrophoretisiert. Die Gele werden in Scheibchen geschnitten und die γ-Strahlung gemessen.
BPB = Bromphenol-Blau, OV = Ovalbumin, CHY = Chymotrypsinogen, CYT = Cytochrom c, INS = Insulin, INS A = Insulin-A-Kette.

3.4.

Messenger RNS aus Hunde-Pankreas: Isolierung, Charakterisierung, zell-freie Translation und Insulin-Immunoreaktivität der Translations-Produkte.

3.4.1.

Isolierung von Polysomen aus Hunde-Pankreas und ihre Charakterisierung.

Bei einem Ausgangsmaterial von jeweils ca. 40 g Hunde-Pankreas variierte die Ausbeute an Polysomen bei unabhängigen Aufarbeitungen zwischen 500 und 800 EU^{260}. Der Quotient E_{260}/E_{280} lag bei verschiedenen Präparationen zwischen 1.75 und 1.85. Für nach derselben Methode isolierte Polysomen aus Ratten-Leber liegt er im selben Bereich. Bei der analytischen Charakterisierung der Polysomen-Präparationen im Rohrzucker-Gradienten ergaben sich beim Vergleich der Sedimentations-Profile von Polysomen aus Hunde-Pankreas und Ratten-Leber keine signifikanten Unterschiede (6A,6B). Bei der Inkubation von Ratten-Leber-Polysomen mit einem 30 000g Überstand aus Hunde-Pankreas (2.3.) traten keine wesentlichen Änderungen im Sedimentations-Verhalten der Polysomen auf (6C). Bei schonender Behandlung der Polysomen mit Ribonuclease A flottieren Proteine auf dem Gradienten, der Monosomen-Peak ist die eindeutig dominierende Spezies (6D). Monosomen-Aggregate (Disomen,Trisomen) sind als Schultern des Monosomen-Peaks zu erkennen. Bei weiterer Behandlung mit Ribonuclease A (6E) verschwindet auch die Monosomen-Spezies beim Scannen der Gradienten, denn die freigesetzten Proteine, ihre Aggregate, Ribo-, Oligo- und Polyribonucleotide absorbieren auch bei 254 nm und verdecken damit die Monosomen-Spezies.

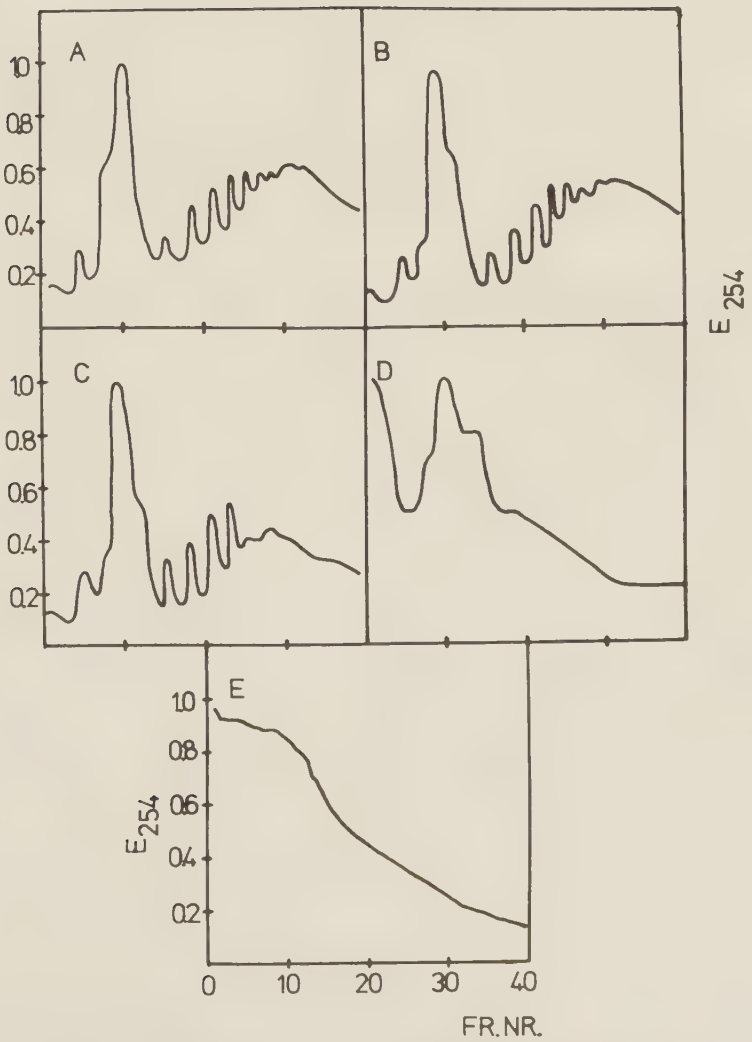

Abb.6: Analytische Untersuchung von Polysomen im Sucrose-Gradienten (Sedimentation von links nach rechts). Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.6: Analytische Charakterisierung von Polysomen durch ihr Sedimentations-Verhalten.
(6A): Polysomen aus Ratten-Leber
(6B): Polysomen aus Hunde-Pankreas
(6C): Ratten-Leber Polysomen werden mit 30.000g Überstand aus Hunde-Pankreas über Nacht bei 25° C inkubiert
(6D): Polysomen aus Hunde-Pankreas werden mit 1 µg Ribonuclease A 5 Minuten bei 4° C behandelt und anschließend mit Heparin auf 100 µg/ml eingestellt
(6E): Polysomen aus Hunde-Pankreas werden mit 2 µg Ribonuclease A bei 25° C über Nacht inkubiert.

3.4.2.

Charakterisierung von messenger RNS aus Polysomen durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation.

Appliziert man mit SDS disintegrierte Polysomen auf Oligo-dT-Cellulose, bindet nicht nur m-RNS, sondern auch ein Teil der ribosomalen RNS. Bei der Untersuchung von RNS mit Affinität zu Oligo-dT-Cellulose tritt die 18 S Komponente der ribosomalen RNS als diskreter Gipfel auf (7B). Die 5 S Komponente neigt offenbar nicht zu unspezifischer Bindung, sie tritt im Sedimentations-Profil von (7B) nicht auf, wohl aber bei der Sedimentation von Ribonucleinsäuren ohne Affinität zu Oligo-dT-Cellulose (7A). Bei nochmaliger Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose kann der 18 S Gipfel jedoch diskriminiert werden (7C). Für die Stimulierung der zell-freien Translation scheint eine Mindestgröße für die m-RNS erforderlich zu sein. Die Gradienten-Fraktionen stimulieren die zell-freie Protein-Biosynthese erst ab S-Werten von etwa sechs signifikant (7B,7C). Bei S-Werten von 18 und größer wird die Translation noch maximal 10-20 fach stimuliert (7B,7C). Es läßt sich hier nicht entscheiden, ob es sich bei diesen hochmolekularen Spezies um diskrete m-RNS oder um Aggregations-Artefakte handelt. Vergleicht man (7B) und (7C) miteinander und berücksichtigt die Translations-Daten, läßt sich sagen, daß m-RNS aus Hunde-Pankreas eine Population von Molekülen ist, die bevorzugt im Intervall zwischen 6 und 18 S banden.

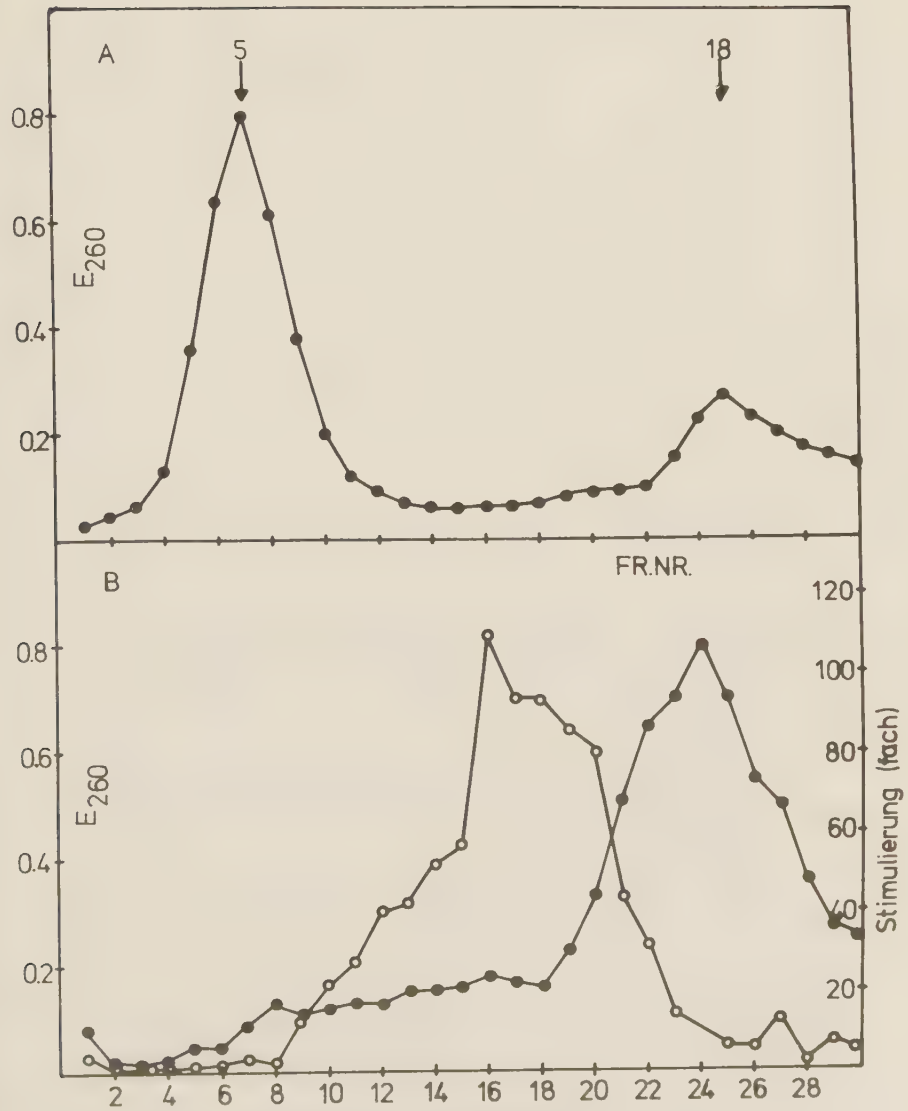

Abb.7: Sucrose-Gradienten-Zentrifugation (2.4.2.) von R.S-Präparationen aus Polysomen von Hunde-Pankreas (Legende siehe nächste Seite).

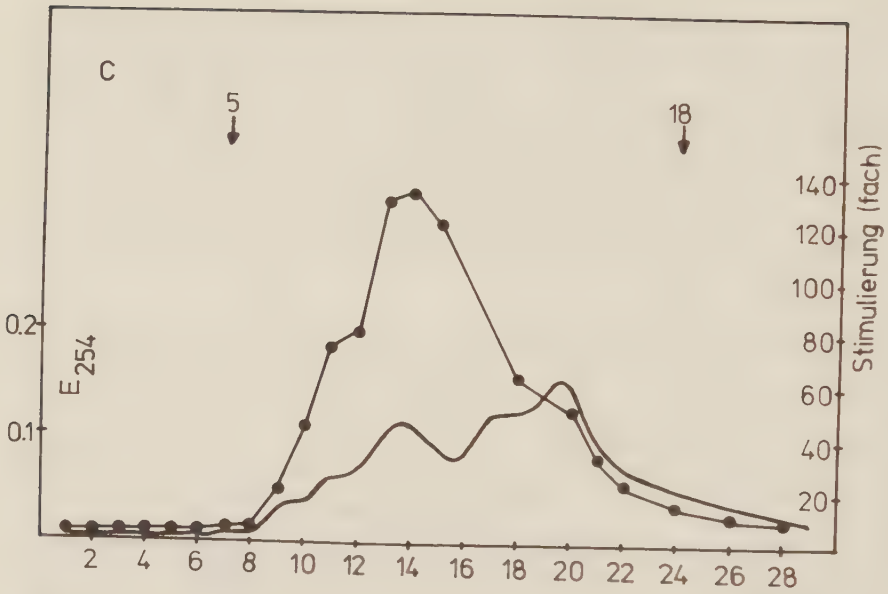

Abb.7: Sucrose-Gradienten-Zentrifugation von RNS-Präparationen aus Polysomen von Hunde-Pankreas (2.4.2.)
(7A): Polysomale RNS ohne Affinität zu Oligo-dT-Cellulose
(●●) Absorption bei 260 nm
(7B): m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Oligo-dT-Cellulose
(●●) Absorption bei 260 nm
(○○) Stimulierung der zell-freien Translation gegenüber der endogenen Synthese des Systems
(7C): m-RNS mit Affinität nach zweimaliger Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose
(——) Absorption bei 254 nm
(●●) Stimulierung der zell-freien Translation gegenüber der endogenen Synthese des Systems

Die Extinktionen der Gradienten in (A) und (B) wurden bei 260 nm gemessen, der Gradient (C) wurde bei 254 nm mit einem Absorptions-Monitor gescannt.
Bei (B) und (C) werden die Fraktionen mit Äthanol präzipitiert, in jeweils 50 µl bidest. Wasser gelöst und davon 10 µl zell-frei übersetzt. Die angegebenen Stimulierungen sind auf Translations-Ansätze ohne Zugabe exogener m-RNS bezogen.
In (7B) wurden sechs Gradienten fraktioniert, identische Fraktionen gepoolt, ausgefällt und wie beschrieben übersetzt.

3.4.3.

Untersuchung der Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen von Hunde-Pankreas.

Die Translations-Produkte des zell-freien Systems sind eine Funktion der exogen angebotenen m-RNS. Dies geht aus dem Vergleich der in Abb. 8 dargestellten gelelektrophoretischen Auftrennung der Translations-Produkte von unfraktionierter m-RNS aus Hunde-Pankreas und einer durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation gewonnenen 9 S m-RNS (=Fraktion 12 von Abb. 7C) aus Hunde-Pankreas hervor. Auch mit der fraktionierten m-RNS treten Translations-Produkte im gesamten, hier erfaßten Molekular-Gewichtsbereich auf, im Bereich zwischen 8000 und 15 000 D ist jedoch eine starke Häufung zu erkennen. Die Produkte der endogenen Synthese des Weizenkeim-Systems verteilen sich um einen Gipfel bei 13 000 D.

Bei der Programmierung des Systems mit TMV-RNS (13), mit m-RNS aus Ratten-Leber (47) oder mit m-RNS aus Hunde-Pankreas konnte die individuelle "Antwort" des Systems auf verschiedene m-RNS Präparationen durch gelelektrophoretische Analyse der Translations-Produkte bestätigt werden.

Daß es sich bei den Produkten des Systems tatsächlich um Proteine handelt, wurde durch Behandlung der Translations-Ansätze mit 20 µg Trypsin bewiesen. Es tritt bei der elektrophoretischen Untersuchung der Produkte ein breiter Gipfel zwischen MG 2500 und 3500 auf, aber auch bei höheren Molekular-Gewichten befinden sich Fragmente.

Die Behandlung mit Ribonuclease A nach beendeter Translation ist sehr wichtig, da sonst eine völlig falsche Molekular-Gewichtsverteilung der Produkte vorgetäuscht wird. Es werden, wenn dies nicht erfolgt, ^{3}H-Leu-t-RNS Komplexe mitelektrophoretisiert (MG 30 000).

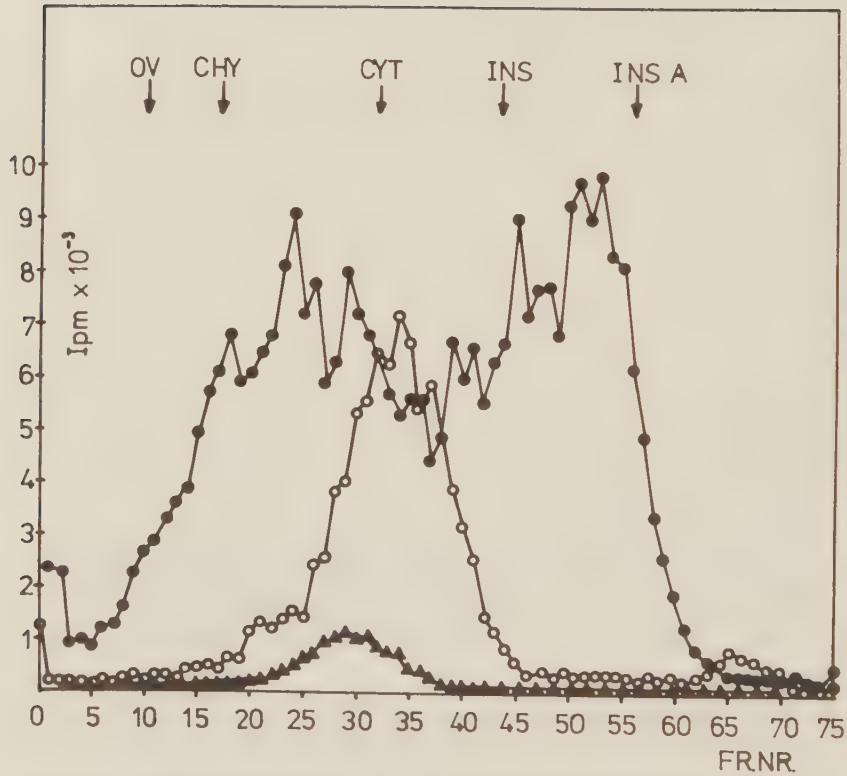

Abb.8: Gelelektrophorese von Translations-Produkten (2.7.2.)
(▲—▲) Endogene Synthese des zell-freien Translations-Systems
(●—●) Translations-Produkte von unfraktionierter m-RNS aus Hunde-Pankreas
(○—○) Translations-Produkte von Gradienten-Fraktion 12 von Abb. 7C
Die Gele werden mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten, über Nacht mit H_2O_2 inkubiert und die Radioaktivität mit Toluol-Triton-Szintillator (2.7.1.) ausgezählt.

2.4.4.

Gel-Elektrophorese von Immunopräzipitaten der Translations-Produkte von m-RNS mit verschiedenen S-Werten.

Das Molekular-Gewicht von Präproinsulin wurde in der Literatur zu 11500 bis 12000 D beschrieben (1-10). Setzt man das durchschnittliche Molekular-Gewicht einer Aminosäure zu 100 D ein, erwartet man etwa 120 Aminosäuren. Da eine Aminosäure durch drei Nucleotide codiert wird, entspricht die Information für Präproinsulin auf der entsprechenden m-RNS etwa 360 Nucleotide. Eukaryotische m-RNS enthält zusätzlich zum codierenden Abschnitt am 3'-Ende ein Poly A-Segment von 50 - 200 Nucleotiden Länge (31). Man erwartet also 410 - 560 Nucleotide für die Präproinsulin m-RNS.

Hier wird nicht berücksichtigt:

a) Eventuell dem Start-Codon vorgeschaltete repetitive Sequenzen am 5'-Ende (32)
b) Eventuelle haarnadelförmige Schleifen, die dem Poly A-Segment vorgeschaltet sind (32).

Setzt man in einer groben Näherung für ein Nucleotid das Molekular-Gewicht 300 ein (33), erwartet man für die Präproinsulin m-RNS Molekular-Gewichte zwischen 12.3×10^4 und 16.8×10^4 D. Der Sedimentations-Koeffizient ist für einsträngige Nucleinsäuren mit dem Molekular-Gewicht durch folgende Formel korreliert: $S = 2.1 \times 10^{-2} \times M^{1/2}$ (34)

Auf die oben angegebenen Molekular-Gewichte angewandt, erhält man für Präproinsulin m-RNS die S-Werte von 7.4 und 8.6. Die Fraktionen 11-14 des Gradienten der Abb.7C wurden deshalb übersetzt, die Translations-Produkte in den doppelten Antikörper-Test (2.6.) eingesetzt und die Immunopräzipitate elektrophoretisiert (2.7.3.). Aus den Abbildungen 9A - 9D geht hervor, daß Präproinsulin als Translations-Produkt der Gradienten-Fraktionen 11 und 12 nachgewiesen werden kann. Dies entspricht S-Werten von 8 und 9 für die zugehörige m-RNS.

Aus dem Vergleich der eingesetzten Ipm und dem Ausmaß der Competition bei MG 12000 (9A,9B), läßt sich schließen, daß die m-RNS für Präproinsulin mit der Technik der Gradienten-Zentrifugation nur außerordentlich schwach angereichert werden kann.

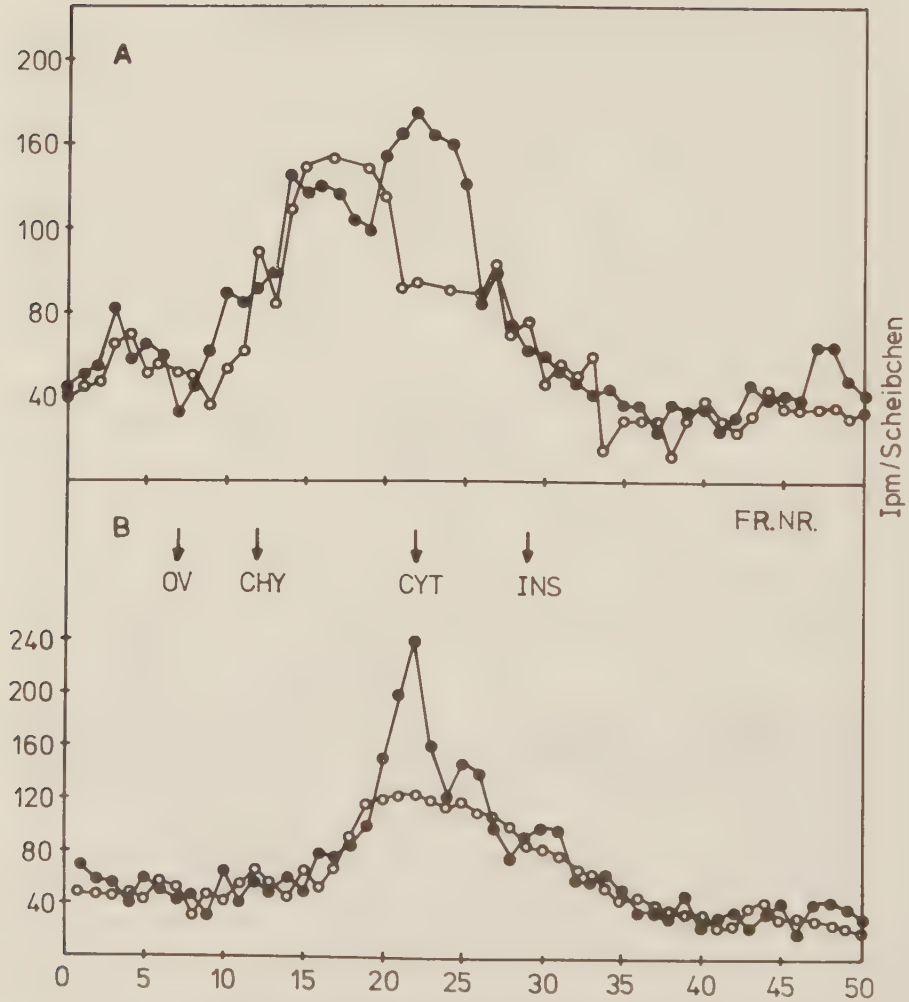

Abb.9: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten mit Translations-Produkten von m-RNS aus Hunde-Pankreas. Legende siehe übernächste Seite.

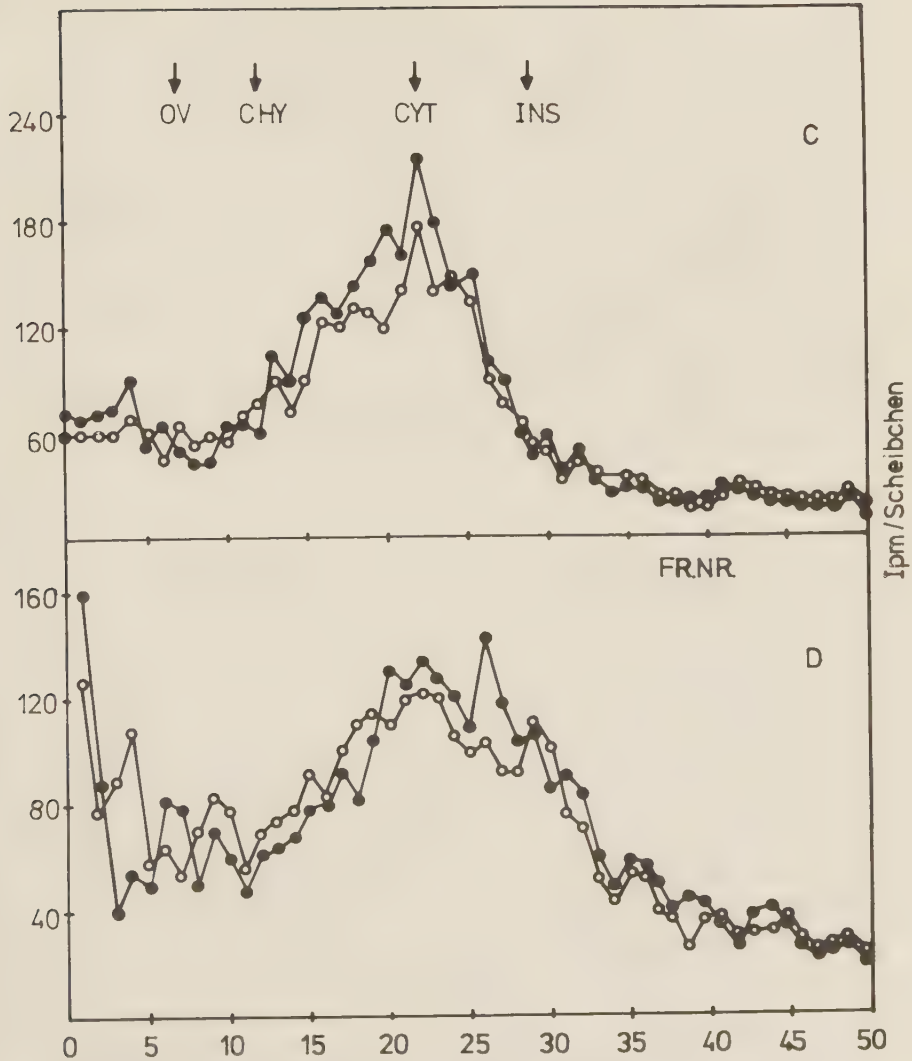

Abb.9: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten mit Translations-Produkten von m-RNS aus Hunde-Pankreas. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.9: Nachweis von Präproinsulin unter den Translations-Produkten von m-RNS aus Hunde-Pankreas.
Die Fraktionen 11-14 des Gradienten der Abb.7C wurden übersetzt, die Translations-Produkte in den doppelten Antikörper-Test (2.6.) eingesetzt und die Immunopräzipitate elektrophoretisiert (2.7.3.).
(9A): Fraktion 11; pro Immunopräzipitat wurden 770.000 Ipm eingesetzt;
(9B): Fraktion 12; es wurden jeweils 840.000 Ipm eingesetzt;
(9C): Fraktion 13; 1.350.000 Ipm wurden pro Immunopräzipitat angeboten;
(9D): Fraktion 14; 1.245.000 Ipm wurden jeweils angeboten.
Die Gele werden mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität nach (2.7.1.) ausgezählt.
(●—●) Ohne Competition durch Insulin
(o—o) Mit Competition durch Insulin
Die Pfeile geben die Position von Eichproteinen an:
OV = Ovalbumin (MG 46.000), CHY = Chymotrypsinogen (MG 26.000), CYT = Cytochrom c (MG 12.000), INS = Insulin (MG 6.000).
Bromphenol-Blau wandert bis zur Fraktion 50.

3.4.5.

Isolierung und zell-freie Translation von m-RNS aus diskreten Ribosomen-Klassen.

Die präparative Isolierung von diskreten Ribosomen-Klassen durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation (2.3.) lieferte zwei Grund-Typen von Sedimentations-Profilen (10A,10B), die bei verschiedenen Präparationen auftraten. Im einen Fall (10A), treten die n-Somen als klar voneinander abgetrennte Peaks auf, im anderen Falle (10B), sind einige von ihnen nur als Schultern angedeutet. Wie aus (10A) und (10B) ersichtlich, kann man im linearen Sucrose-Gradienten mindestens bis zu den Hexasomen diskriminieren. Die Monosomen-Komponente (I) ist die klar dominierende Spezies, stets aber tritt bei der präparativen Isolierung eine ihr vorgeschaltete Komponente (0) auf. Di-(II), Tri-(III) und Tetrasomen (IV) werden wie in Abb.10 dargestellt identifiziert. Fraktion V setzt sich aus einer Mischung aus Penta- und Hexasomen zusammen. Eine weitere Selektion scheitert an der mangelnden Auflösung, man unterteilt in PI,PII und PIII.

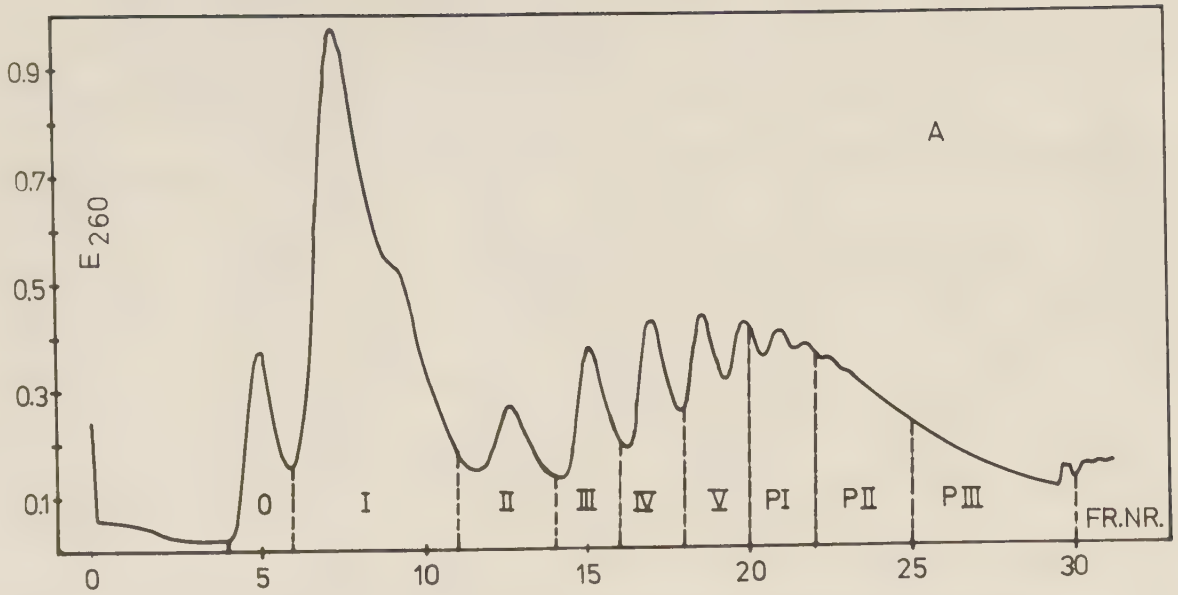

Abb.10: Sedimentations-Profil bei der Auftrennung von Polysomen aus Hunde-Pankreas in Unter-Klassen (2.3.) Legende siehe nächste Seite bei Abb. 10 B.

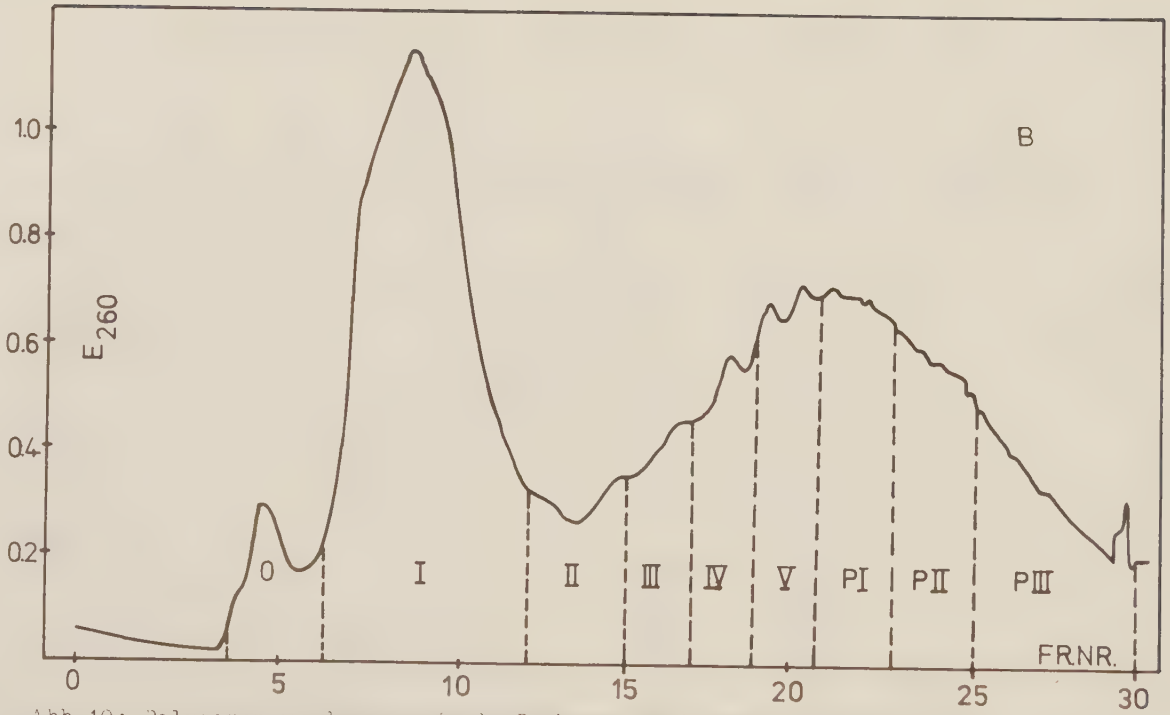

Abb.10: Polysomen wurden aus Hunde-Pankreas isoliert und anschließend durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation präparativ in Unter-Klassen aufgetrennt (2.3.). (A) und (B) zeigen die Sedimentations-Profile von zwei verschiedenen Präparationen.
O = Monosomen-Vorpeak, I = Monosomen, II = Disomen, III = Trisomen, IV = Tetrasomen, V = Penta- und Hexasomen; PI, PII und PIII sind Teil-Fraktionen mit größeren ($n > 6$) Polysomen.

Fraktion	% Affinität zu Oligo-dT-Cell	TCA fällbare Ipm in 50 µl	µg m-RNS pro Transl. Ansatz	Stimulierung
C	0.70	145.000	0.5	4.8
I	0.25	1.000.000	1.3	33
II	1.40	2.220.000	2.3	74
III	2.00	1.420.000	1.7	47
IV	2.70	1.200.000	1.5	40
V	1.60	1.555.000	2.1	52
PI	2.55	1.480.000	11	49
PII	5.00	1.320.000	16	44
PIII	1.50	190.000	4.6	6.3

Tabelle I: Polysomen aus Hunde-Pankreas werden durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation in diskrete Unter-Klassen aufgetrennt (Abb.10). Fraktionen mit denselben Unter-Klassen werden aus sechs identischen Gradienten gepoolt und daraus die m-RNS isoliert (2.4.3.). Die isolierte m-RNS wird im zell-freien System aus Weizen-Keimen übersetzt (2.5.2.) und die TCA-fällbare Radioaktivität bestimmt (2.5.3.). Die angegebenen Stimulierungen beziehen sich auf die endogene Synthese des Systems (30.000 Ipm/50 µl). In der Spalte 2 wird registriert, wieviel Prozent der auf Oligo-dT-Cellulose applizierten EU_{260} Affinität zu diesem Material haben.

Aus den einzelnen Ribosomen-Klassen isolierte m-RNS erweist sich als sehr gut translatierbar (Tabelle I). Die Stimulierung der zell-freien Translation von m-RNS aus den Fraktionen O und PIII ist wesentlich schwächer als die von m-RNS aus den übrigen Fraktionen.
Zentrifugiert man eine aus Weizen-Keimen isolierte S-30 Fraktion (2.5.1.) unter denselben Bedingungen wie Polysomen aus Hunde-Pankreas (siehe Abb.10), findet man beim Scannen der Gradienten ausschließlich den Monosomen-Peak bei 80 S. Dies bedeutet, daß die Polysomen bei der zell-freien Translation erst durch Zugabe exogener m-RNS gebildet werden und erklärt somit auch die geringe endogene Synthese des Systems.

3.4.6.
Translations-Produkte von m-RNS aus diskreten n-Somen.
Man sollte erwarten, daß verschiedene Ribosomen-Klassen (z.B. Disomen und Pentasomen) unterschiedlich große m-RNS Moleküle tragen und deshalb eine unterschiedliche Population von Proteinen codieren. Dies sollte durch zell-freie Translation der entsprechenden m-RNS und anschließende gelelektrophoretische Untersuchung der Translations-Produkte nachgewiesen werden können. Abb. 11A und 11B zeigen, daß in den Profilen der Translations-Produkte von Disomen und Pentasomen die beiden dominierenden Peaks gemeinsam auftreten. Im Disomen-Profil (11A) tritt zwischen beiden Peaks ein Tal auf, im Pentasomen-Profil (11B) dagegen zusätzliche Banden von Translations-Produkten. Diese zusätzlichen Banden ("Substrukturen") sind Ausdruck einer größeren Codierungs-Kapazität der m-RNS aus Pentasomen gegenüber der aus Disomen.

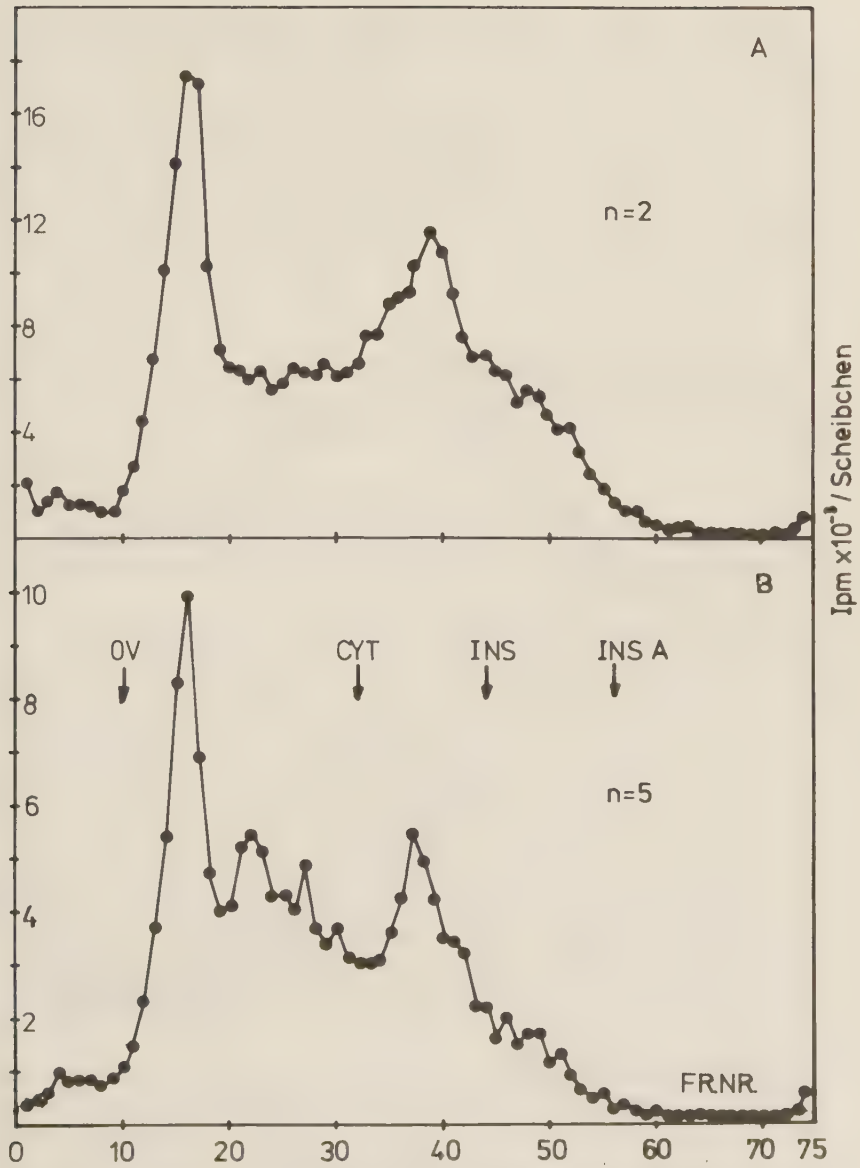

Abb.11: Gel-Elektrophorese von Translations-Produkten aus Disomen und Pentasomen. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.11: Gelelektrophoretische Untersuchung (2.7.2.) von Translations-Produkten von m-RNS aus Disomen und Pentasomen.
(A): Translations-Produkte von m-RNS aus Disomen
(B): Translations-Produkte von m-RNS aus Pentasomen
Die Gele werden mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität nach (2.7.1.) ausgezählt. Bromphenol-Blau wandert bis zu Fraktion 74.
OV = Ovalbumin (MG = 46.000), CYT = Cytochrom c (MG = 12.400), INS = Insulin (MG = 6.000), INS A = Insulin-A-Kette (MG = 2.500).

3.4.7.

Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten der Translations-Produkte von m-RNS aus diskreten n-Somen.

Für die experimentelle Durchführung ist folgendes entscheidend:

a) Die Translations-Produkte müssen nach beendeter Translation mit Ribonuclease A behandelt werden. Geschieht dies nicht, tritt eine unspezifische Bindung von bis zu 10% der applizierten Ipm auf.

b) Die Translations-Ansätze müssen nach Ribonuclease-Behandlung abzentrifugiert werden und die Überstände mit den Immunopräzipitaten inkubiert werden. Nach Behandlung mit Ribonuclease tritt eine Trübung der Translations-Ansätze auf; durch Zentrifugation in der Microfuge erhält man sichtbare Niederschläge. Zentrifugiert man nicht, treten unspezifische Bindungen von bis zu 20% der applizierten TCA-fällbaren Ipm auf.

c) Die Translations-Produkte müssen mit den Immunopräzipitaten zur quantitativen Bindung mindestens 48 Stunden bei 4° C inkubiert werden (Vorversuche mit ^{125}I-Insulin haben ergeben, daß nach 12 Stunden erst 50% der applizierten Ipm gebunden werden).

d) Die Immunopräzipitate müssen vor der Gelelektrophorese so lange gewaschen werden, bis im Überstand nicht mehr als 100 Ipm pro Milliliter Wasch-Puffer registriert werden können.

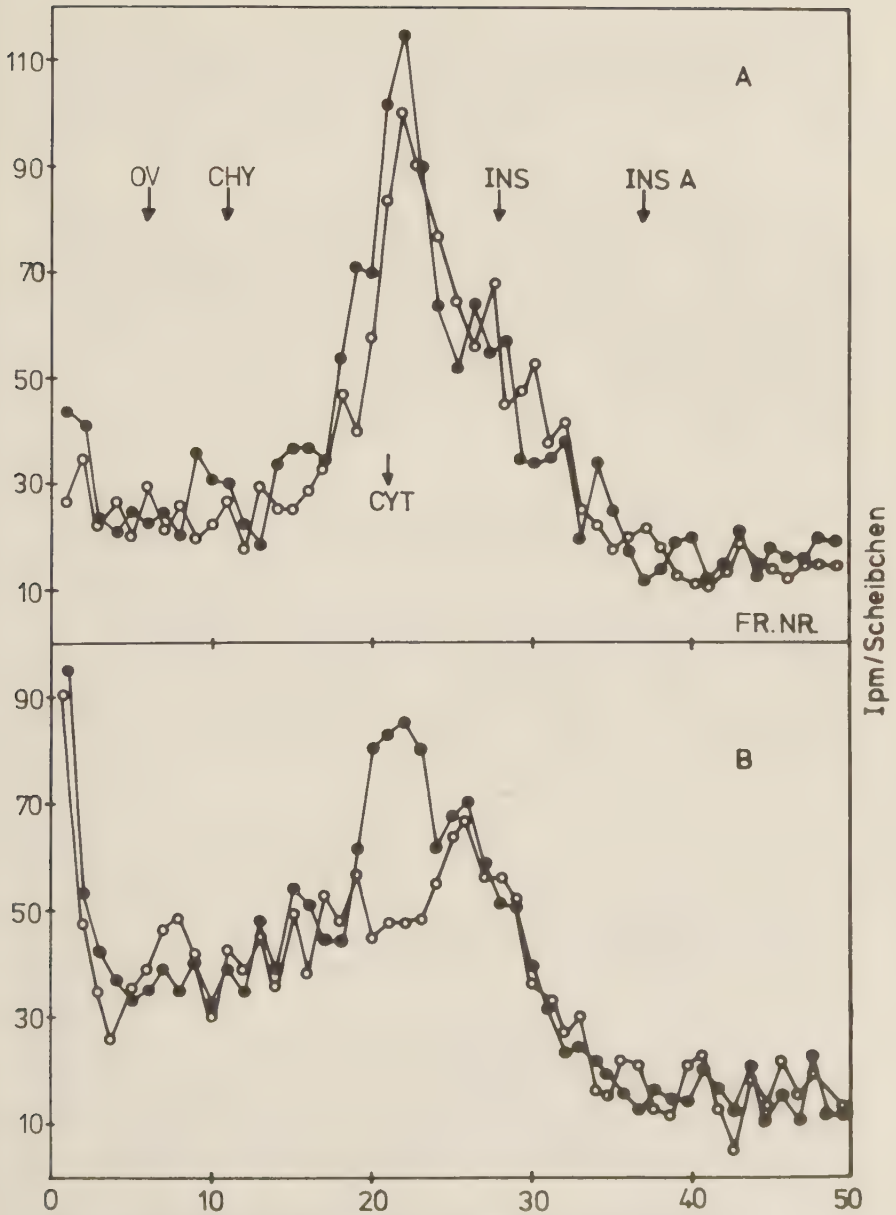

Abb.12: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten mit Translations-Produkten von m-RNS aus diskreten n-Somen aus Hunde-Pankreas. Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.12: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten in 20%igen Polyacrylamid-Gelen.
(12A): Immunopräzipitate mit Translations-Produkten von m-RNS aus Disomen.
Eingesetzt pro Immunopräzipitat: 1.000.000 Ipm.
(12B): Immunopräzipitate mit Translations-Produkten von m-RNS aus Pentasomen und Hexasomen.
Eingesetzt pro Immunopräzipitat: 520.000 Ipm.
(●—●): Ohne Competition durch Insulin.
(○—○): Mit Competition durch 10 µg Insulin.
Die Immunopräzipitate wurden nach (2.6.) hergestellt, nach (2.7.1. und 2.7.3.) elektrophoretisiert, die Gele anschließend mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität nach (2.7.1.) bestimmt.
Bromphenol-Blau wandert bis zur Fraktion 49.
OV = Ovalbumin (MG = 46.000), CHY = Chymotrypsinogen (MG = 26.000), CYT = Cytochrom c (MG = 12.000), INS = Insulin (MG = 6.000), INS A = Insulin A-Kette (MG 2.500).

Abb. 12A zeigt, daß sich unter den Translations-Produkten von m-RNS aus Disomen insulin-immunoreaktives Material nicht nachweisen läßt. Unter den Translations-Produkten von m-RNS aus Bereich V (Pentasomen,Hexasomen) der Sedimentations-Profile von Polysomen aus Hunde-Pankreas (siehe Abb.10), läßt sich insulin-immunoreaktives Material identifizieren (12B). Dies war die einzige Klasse von Ribosomen, bei der ein solcher Nachweis erbracht werden konnte.

3.5.
Versuche zur Isolierung von Präproinsulin messenger RNS durch Immunoreaktion von Polysomen mit immobilisierten Antikörpern.

3.5.1.
Prinzip der Methode und Verhalten der immobilisierten Antikörper gegenüber ^{125}I-Insulin.

An den aus Hunde-Pankreas isolierten Polysomen haften trotz zeitweiliger Behandlung mit 1% Triton X100 und 1% Natrium-Deoxycholat während der Präparation (2.3.) noch nascierende Proteine. Dies geht aus Publikationen hervor, bei denen Polysomen aus anderen Geweben mit ähnlichen Methoden isoliert wurden (35,36).
Man müßte also erwarten, daß es eine kleine Population von Pankreas-Polysomen gibt, die Proinsulin-Moleküle und die zugehörige m-RNS tragen. Inkubiert man die Polysomen mit an Sepharose immobilisierten Antikörpern gegen Rinder-Insulin, bzw. Proinsulin, sollten die das Antigen tragenden Polysomen mit den Antikörpern reagieren und damit die gewünschte Polysomen-Klasse am Säulen-Material haften bleiben. Elution mit SDS-haltigem Puffer (0.5%), sollte die zurückgehaltenen Polysomen in ribosomale Proteine, ribosomale RNS und messenger RNS dissoziieren, welche man an Oligo-dT-Cellulose abtrennen kann. Die Prüfung der Produkte der zell-freien Translation der isolierten m-RNS auf Insulin-Immunoreaktivität mit der doppelten Antikörper-Methode sollte darüber entscheiden, ob es mit dieser Methode gelingt, Proinsulin-Ketten tragende Polysomen zu selektieren und damit die zugehörige m-RNS anzureichern.
Dazu wurde zunächst das Bindungs-Verhalten von ^{125}I-Insulin gegenüber den mit Antikörpern bzw. Kontroll-Gamma-Globulin-Fraktion beladenen Sepharose-Säulen getestet (Tabelle II). Die Tatsache, daß sowohl Antikörper-Insulin-Sepharose, als auch Antikörper-Proinsulin-Sepharose ^{125}I-Insulin binden,

Säule	Aufgetragen (^{125}I-Ins.)	Gebunden	% Bindung
Antikörper-Insulin-Sepharose	2.4×10^6 Ipm	1.92×10^6 Ipm	80
Antikörper-Pro-insulin-Sepharose	2.4×10^6 Ipm	1.46×10^6 Ipm	61
Antikörper-Pro-insulin-Sepharose	2.4×10^6 Ipm + 300 µg Ins.	12×10^4 Ipm	5
Kontroll-Gamma-Globulin-Sepharose	2.4×10^6 Ipm	2.4×10^3 Ipm	1

Tabelle II. Bindungs-Verhalten von ^{125}I-Rinder-Insulin an Antikörper-Sepharose-Säulen (2.9.).
Man läßt 100 µl ^{125}I-Insulin (2.4×10^6 Ipm), oder in einem Fall 2.4×10^6 Ipm ^{125}I-Insulin + 300 µg Rinder-Insulin über Nacht bei 4° C im Bettvolumen mit dem Säulenmaterial reagieren. Man wäscht so lange, bis die eluierten Fraktionen (1.5 ml) nicht mehr als 200 Ipm enthalten. Man eluiert (2.9.) und setzt die eluierbaren Ipm in Relation zu den applizierten Ipm.

beweist:

a) die Antikörper sind tatsächlich an das Säulen-Material gekoppelt
b) ihre Bindungsfähigkeit für das Antigen geht durch die Kopplung nicht verloren.

Setzt man nicht-markiertes Rinder-Insulin im Überschuß hinzu, wird die Bindung beträchtlich reduziert. Dadurch wird die Spezifität der Wechselwirkung bewiesen. Eine immobilisierte Gamma-Globulin-Fraktion von nicht animmunisierten Meerschweinchen bindet nur 1% der applizierten Ipm.

Präzipitiert man Serum von mit Rinder-Proinsulin animmunisierten Meerschweinchen mit Antiserum gegen die Immunoglobulin-Fraktion von Meerschweinchen (hergestellt in Ziegen), findet man, daß diese Immunopräzipitate ^{125}I-Insulin nicht binden. Das Serum enthält aber Antikörper, da wie oben gezeigt, die immobilisierte Fraktion ^{125}I-Insulin bindet. Es müßte näher untersucht werden, ob hier Insulin im Serum der Meerschweinchen als Competitor wirkt, oder ob immunopräzipitierte Antikörper gegen Rinder-Proinsulin nicht die Fähigkeit haben, Rinder-Insulin zu binden. Für letztere Behauptung gibt es Hinweise in der Literatur (37,38).

In Kaninchen gelang es nicht, Antikörper gegen Rinder-Proinsulin zu induzieren. Nach Immobilisierung der Gamma-Globulin-Fraktion von animmunisierten Tieren an BrCN-aktivierte Sepharose beobachtet man kein signifikantes Bindungs-Vermögen für ^{125}I-Insulin. Wahrscheinlich wird Rinder-Proinsulin wegen zu geringer Sequenz-Unterschiede zu Kaninchen Proinsulin als immunologisch nicht verschieden erkannt (25).

3.5.2.

Immunoreaktion von Polysomen aus Hunde-Pankreas mit immobilisierten Antikörpern gegen Rinder-Insulin und Rinder-Proinsulin.

Mit der Immunoadsorption von Polysomen aus Hunde-Pankreas an Affinitäts-Säulen wie Antikörper-Insulin-Sepharose und Antikörper-Proinsulin-Sepharose konnte eine entscheidende Anreicherung von m-RNS für Präproinsulin nicht erreicht werden. Isoliert man m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu diesem Säulenmaterial, übersetzt sie im zell-freien System und prüft sie mit dem doppelten Antikörper-Test auf Insulin-Immunoreaktivität, so zeigt sich durch Vergleich der Ipm in den Immunopräzipitaten mit und ohne Competition durch Insulin in Relation zu den insgesamt eingesetzten Ipm, daß Präproinsulin unter den Translations-Produkten sicherlich nicht sehr stark angereichert ist (Tabelle III).
Elektrophoretisiert man Immunopräzipitate von Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose, bzw. Antikörper-Proinsulin-Sepharose, so sollte man im Falle einer Anreicherung von Präproinsulin unter den Translations-Produkten im Competitions-Gel im Molekulargewichts-Bereich von 12.000 eine klare Reduktion der Radioaktivität im Vergleich zum Gel mit einem Immunopräzipitat mit Translations-Produkten, das ohne Competition durch Insulin hergestellt wurde, erwarten. Abbildung 13 zeigt, daß dies bei Translations-Produkten von m-RNS aus Hunde-Pankreas-Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose (13A) und Antikörper-Proinsulin-Sepharose (13B) nicht der Fall ist.
Vergleicht man aber Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit und ohne Affinität zu den Antikörper-Sepharose-Säulen, so treten signifikante Unterschiede auf. Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen ohne Affinität zu diesen Säulen-Materialien zeigen im Elektrophoretogramm (14A) sehr

m-RNS aus	Eingesetzte Ipm Translations-Prod. pro Immunopräzipitat	Ipm mit Aff. zum Immunopräzipitat (ohne Competition)	Ipm mit Aff. (mit Competition)
Polysomen ohne Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose	1.000.000	2.500	2.400
Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose	450.000	1.200	1.050
Polysomen ohne Affinität zu Antikörper-Proinsulin-Sepharose	1.300.000	3.200	3.300
Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Proinsulin-Sepharose	520.000	1.400	1.300

Tabelle III. Insulin-Immunoreaktivität von Translations-Produkten.
Polysomen aus Hunde-Pankreas (bis zu 200 EU**) wurden im Bettvolumen mit oben beschriebenen Säulen-Materialien inkubiert, die m-RNS aus Polysomen mit und ohne Affinität zum Säulenmaterial isoliert und im zell-freien System übersetzt (2.9.). Gleich viele Ipm Translations-Produkte werden zu identischen Immunopräzipitaten gegeben (ohne und mit Competition durch 10 µg Insulin) und die Radioaktivität in den Immunopräzipitaten bestimmt (2.6.).
Abkürzung: Aff. = Affinität.

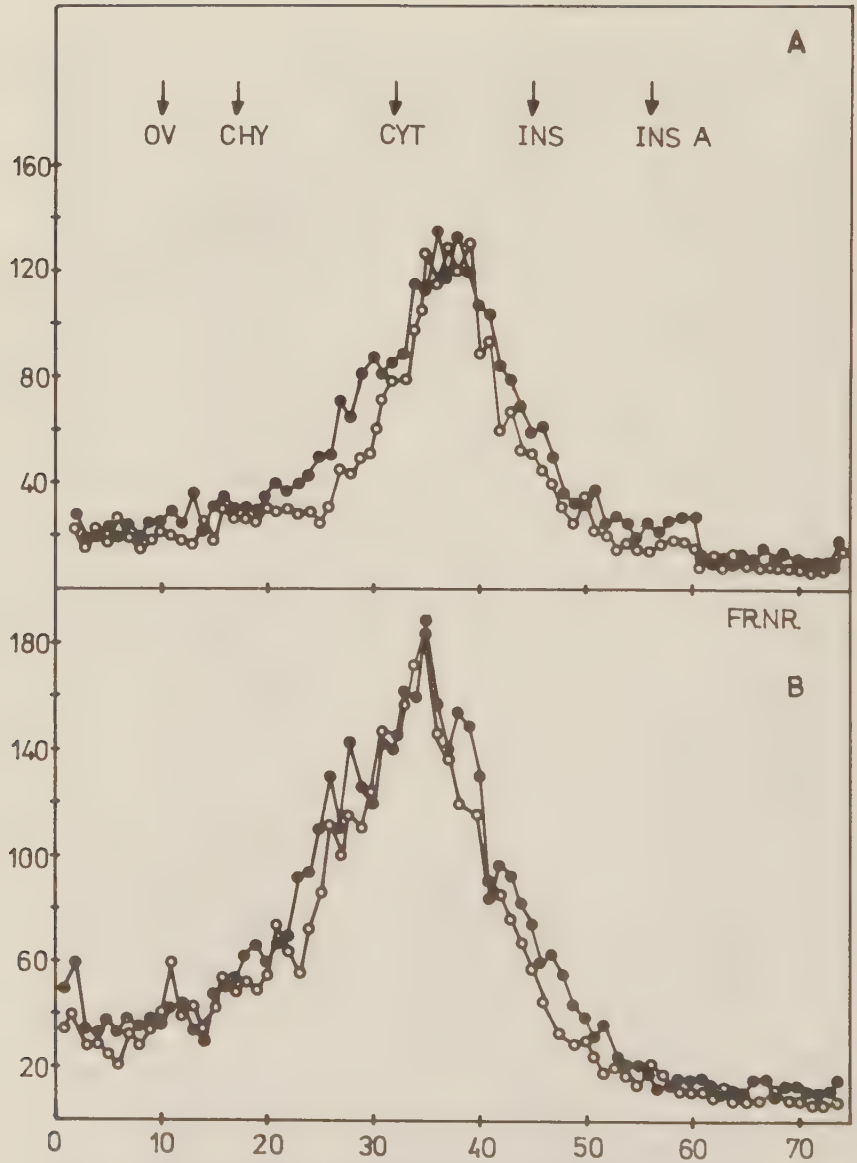

Abb. 13: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten mit Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose (A) und Antikörper-Proinsulin-Sepharose (B). Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.13: Gelelektrophorese von Immunopräzipitaten mit Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose (13A) und Antikörper-Proinsulin-Sepharose (13B).
100 EU^{260} Polysomen aus Hunde-Pankreas wurden bei 4°C über Nacht mit den Antikörper beladenen Säulen inkubiert, die m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu den Säulen-Materialien isoliert (2.9.), im zell-freien System übersetzt (2.5.) und gleich viele Ipm zu identischen Immunopräzipitaten (mit und ohne Competition durch 10 µg Insulin) gegeben (2.6.), die Immunopräzipitate isoliert, gelöst und auf 20%igen Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisiert (2.7.).
Die Gele werden nach der Elektrophorese mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität nach (2.7.1.) bestimmt.
(13A): Pro Immunopräzipitat werden 420.000 Ipm eingesetzt.
(13B): Pro Immunopräzipitat werden 540.000 Ipm eingesetzt.
(●—●): Ohne Competition durch 10 µg Rinder-Insulin.
(o—o): Mit Competition durch 10 µg Rinder-Insulin.
OV = Ovalbumin (MG = 46.000 D), CHY = Chymotrypsinogen (MG = 26.000 D), CYT = Cytochrom c (MG = 12.000 D), INS = Insulin (MG = 6.000 D), INS A = Insulin A-Kette (MG 2.500).

Fortsetzung Text von Seite 44.

viele Banden. Translations-Produkte von Polysomen mit Affinität zu Kontroll-Gamma-Globulin-Sepharose (14C) zeigen im Vergleich zu (14A) eine Verschiebung nach höheren Molekular-Gewichten, was auf eine größere Neigung von größeren Polysomen zu unspezifischer Bindung zurückzuführen sein könnte. Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose (14B) bzw. Antikörper-Proinsulin-Sepharose (14D) sind besonders stark im Molekulargewichts-Bereich zwischen 10.000 und 15.000 D vertreten. Vor allem auf Spezies höheren Molekulargewichts bezogen tritt hier im Vergleich zu den übrigen Elektrophoretogrammen eine klare Reduktion ein.

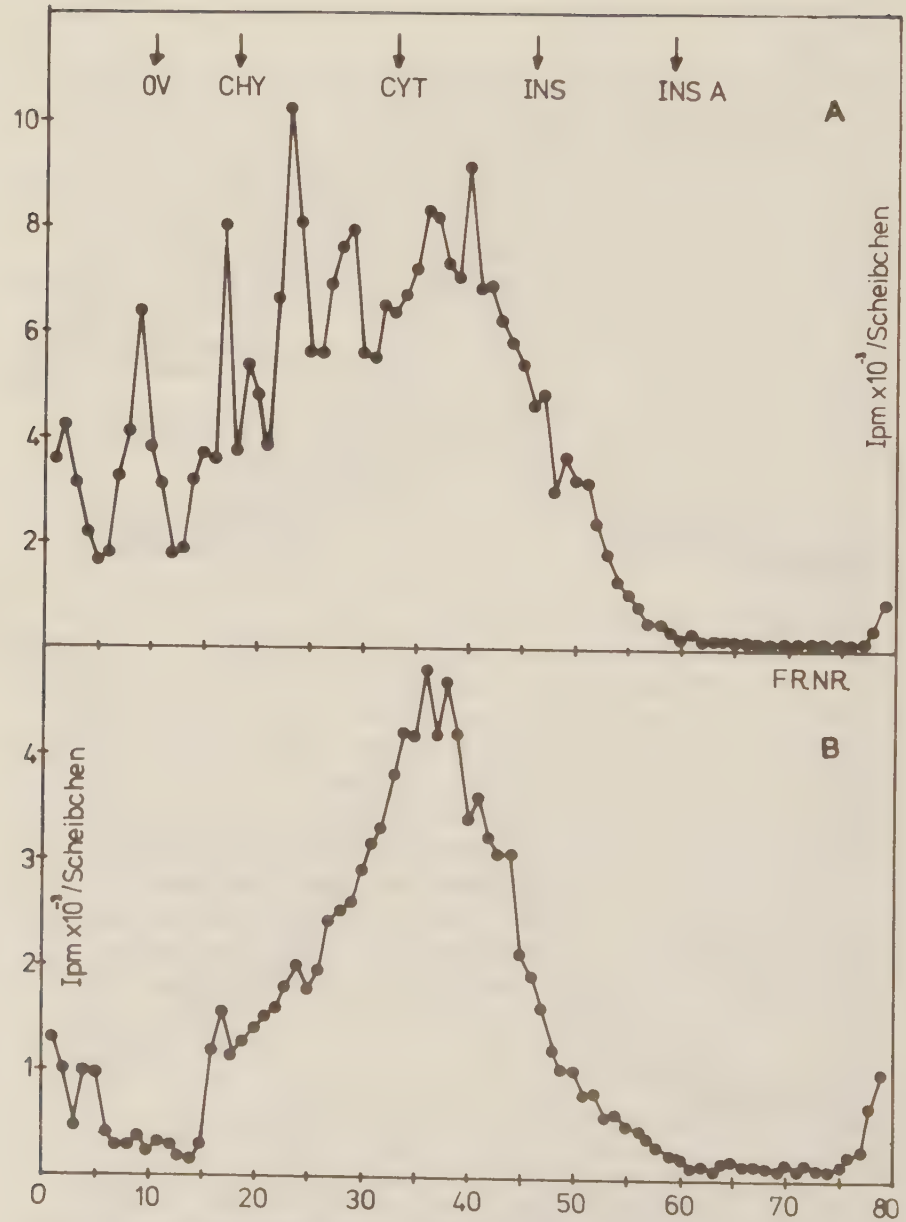

Abb.14: Gelelektrophorese von Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen ohne (A) und mit (B) Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose. Legende siehe Seite 50.

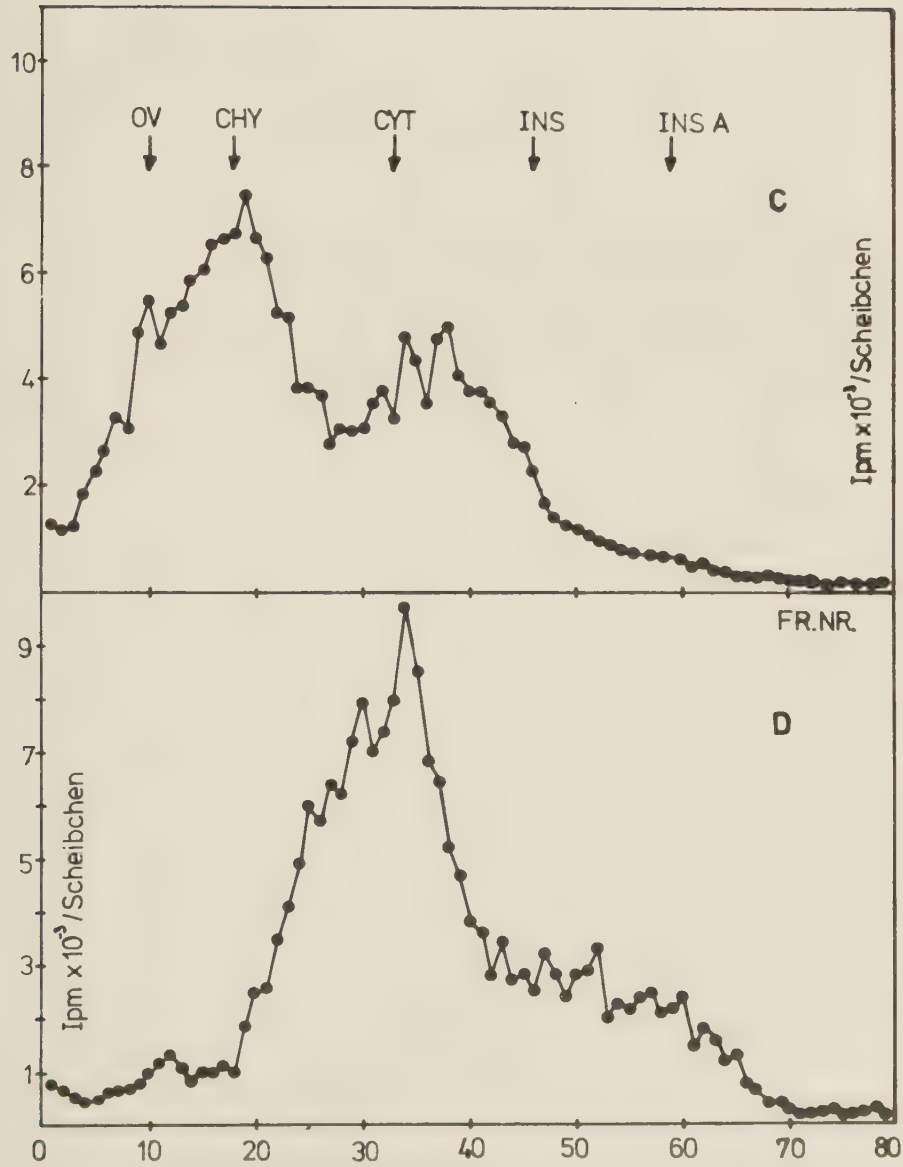

Abb.14: Gelelektrophorese von Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Kontroll-Gamma-Globulin-Sepharose (C) und Antikörper-Proinsulin-Sepharose (D). Legende siehe nächste Seite.

Legende zu Abb.14: Gelelektrophorese von Translations-Produkten in 20%igen Polyacrylamid-Gelen.
Jeweils 100 EU^{260} Polysomen aus Hunde-Pankreas werden nach (2.9.) mit Antikörper beladenen Säulen inkubiert, die m-RNS aus Polysomen mit und ohne Affinität isoliert, im zellfreien System übersetzt (2.5.) und die Translations-Produkte nach (2.7.2.) elektrophoretisiert.
(14A): Translations-Produkte von m-RNS von Polysomen ohne Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose
(14B): Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose
(14C): Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Kontroll-Gamma-Globulin-Sepharose
(14D): Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Proinsulin-Sepharose.
Die Gele werden nach der Elektrophorese mit einem Gelschneider in Scheibchen geschnitten und die Radioaktivität nach (2.7.1.) bestimmt.
OV = Ovalbumin (MG 46.000 D), CHY = Chymotrypsinogen (MG = 26.000 D), CYT = Cytochrom c (MG 12.000 D), INS = Insulin (MG 6.000 D), INS A = Insulin-A-Kette (MG 2.500 D).

4. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst festgestellt, daß Ribonuclease-Gehalt und Abbaugrad von Nucleinsäure-Präparationen aus spezies-verschiedenen Pankreata miteinander korrelieren. Nach Untersuchungen in (11) beträgt der Gehalt an Ribonuclease A in adultem Rinder-Pankreas 1200 µg/g, in Ratten-Pankreas 260 µg/g, in Kaninchen- und Hunde-Pankreas nur 0.5 µg/g Gewebe. Nucleinsäure-Präparationen aus adultem Rinder-Pankreas sind stärker fragmentiert als Präparationen aus Ratten-Pankreas, der geringe Ribonuclease-Gehalt von Kaninchen- und Hunde-Pankreas scheint durch die Extraktions-Methode kontrollierbar zu sein. Die hier vorgelegten Untersuchungen widersprechen eindeutig der von Lomedico et al (1) vertretenen Ansicht, daß der Abbaugrad der nach der von ihnen angegebenen Extraktions-Methode erhaltenen Nucleinsäuren von Typ und Menge der im entsprechenden Gewebe vorhandenen Ribonucleasen unabhängig sei.

Der Befund, daß es gelang, nicht oder wenig fragmentierte Nucleinsäuren aus Hunde-Pankreas durch Gesamt-Nucleinsäure-Extraktion zu isolieren, legte es nahe, die Isolierung von Polysomen aus Hunde-Pankreas zu versuchen. Die Ribonucleinsäuren und speziell die messenger RNS sind zwar durch die Architektur der Ribosomen (39) relativ geschützt, aber andererseits ist bei einer Polysomen-Isolierung die Expositionszeit für Ribonucleasen wesentlich länger als bei der Gesamt-Nucleinsäure-Extraktion. Aus foetalem Rinder-Pankreas (40) gelang es nur mit Hilfe von Antikörpern gegen Ribonuclease A eine Fragmentierung der Polysomen zu Monosomen zu verhindern. Auch die in (41) publizierten Sedimentations-Profile von Polysomen aus Langerhansschen Inseln der Ratte deuten auf starke Fragmentierung hin. Dickman und Bruenger (42) fanden, daß Polysomen aus Hunde-Pankreas Aminosäuren in Proteine inkorporieren, was auf das

Vorhandensein von Polyribosomen schließen läßt. Bei den hier durchgeführten Polysomen Präparationen aus Hunde-Pankreas wurde Heparin als Ribonuclease- und Protease-Inhibitor (43) eingesetzt. Die erhaltenen Sedimentations-Profile weisen zwar die Monosomen als die dominierende Spezies aus, enthalten aber auch Polyribosomen und unterscheiden sich im Sedimentations-Verhalten nicht von Rattenleber-Ribosomen, die nach derselben Methode präpariert wurden. Rattenleber Cytosol enthält bekanntlich einen potenten Ribonuclease-Inhibitor (44,45,46). Behandelt man die Polysomen aus Hunde-Pankreas mit Ribonuclease A, verschwindet der Polyribosomen-Anteil im Sedimentations-Profil, es bleibt im wesentlichen nur noch der Monosomen Peak übrig. Erhöht man die Ribonuclease-Konzentration und verlängert die Inkubations-Zeit werden offenbar auch die Monosomen zerstört. Im Gradienten treten flottierende Proteine und Nucleinsäuren auf. Für die Kontrollierbarkeit der pankreatischen Ribonucleasen spricht auch der Befund, daß sich das Sedimentations-Profil von Rattenleber-Polysomen durch mehrstündige Inkubation mit einem Hunde-Pankreas 30.000g Überstand nicht signifikant verändert. Bei den hier angegebenen Sedimentations-Profilen bei der Auftrennung der Polyribosomen im Rohrzucker-Gradienten tritt stets ein den Monosomen vorgeschalteter Peak auf. Es könnte sich dabei um ribosomale Untereinheiten oder um von den Ribosomen abgelöste Ribonucleinsäuren handeln. Das von Präparation zu Präparation etwas variierende Sedimentations-Verhalten der Polysomen aus Hunde-Pankreas kann bedingt sein

a) durch Konzentrations-Effekte (je weniger EU^{260} aufgetragen werden, desto besser die Auftrennung)
b) durch etwas variierende Bedingungen beim Homogenisieren des Gewebes.

Aus den Gesamt-Nucleinsäuren oder den Polysomen wurde messenger RNS durch Oligo-dT-Cellulose Chromatographie gewonnen. Die Analyse der Nucleinsäuren mit Affinität zu Oligo-dT-Cellulose im Rohrzucker-Gradienten zeigte eine starke Kontamination der Poly A-haltigen RNS mit ribosomaler RNS. Dabei neigt vor allem die 18 S Komponente zu unspezifischer Bindung (die 28 S Komponente wurde nicht untersucht). Die 5 S Komponente der ribosomalen RNS tendiert nicht zu unspezifischer Bindung. Wie die Gradienten-Analysen zeigen, konnte die Kontamination der messenger RNS durch ribosomale RNS durch eine nachgeschaltete Chromatographie an Oligo-dT-Cellulose beseitigt werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten m-RNS Präparationen wurden deshalb zwei Mal an Oligo-dT-Cellulose chromatographiert. Untersucht man die so isolierten m-RNS Moleküle unter die Aggregation nicht begünstigenden Bedingungen im Sucrose-Gradienten, so tritt eine unterschiedliche Verteilung der Sub-Populationen auf die verschiedenen S-Werte auf. Dies spricht gegen eine Fragmentierung der isolierten m-RNS. M-RNS Moleküle mit S-Werten kleiner als sechs traten nie auf. Moleküle mit S-Werten größer 18 liegen auf dem absteigenden Ast der Verteilungskurve.

Der Nachweis, daß es sich tatsächlich um m-RNS handelte, wurde durch deren Translatierbarkeit in einem zell-freien System aus Weizen-Keimen erbracht. Die Stimulierung der Protein-Biosynthese gegenüber der endogenen Synthese des Systems variierte mit verschiedenen S-30 Präparationen zum Teil beträchtlich. Mit guten S-30 Fraktionen wurden mit dem optimierten Translations-System durch 2 µg m-RNS aus Hunde-Pankreas bis zu 100 fache Stimulierungen erzielt. Als optimale Parameter erwiesen sich: 3 mM Mg^{2+}, 100 mM K^{+} , 4 mM PEG oder 60 µM Spermin. Setzt man PEG und Spermin mit ihren optimalen Konzentrationen in das System ein, so kann ein synergistischer Effekt nicht beobachtet werden. Die ausge-

prägte Abhängigkeit der zell-freien Translation von der Magnesium- und Kalium-Konzentration könnte ihre Ursache darin haben, daß unter nicht optimalen Ionenbedingungen die Initiation der Peptid-Ketten reduziert ist. Dies hätte eine Reduktion der in TCA-fällbares Material inkorporierten Radioaktivität zur Folge, die Molekulargewichts-Verteilung der Translations-Produkte wäre jedoch bei verschiedenen Ionen-Bedingungen dieselbe. Dies ist aber nicht der Fall. Die Verteilung der Molekular-Gewichte der Translations-Produkte von m-RNS aus Hunde-Pankreas ist stark von den Ionen-Bedingungen abhängig. Bei suboptimalen Magnesium- und Kalium-Konzentrationen ist eine Anhäufung nieder-molekularer Peptid-Fragmente zu beobachten. Bei wesentlicher Überschreitung des Optimums der Magnesium-Konzentration (7 mM) wurde derselbe Effekt beobachtet. Nähert man sich mit den Ionen-Bedingungen dem Translations-Optimum, tritt eine kontinuierliche Erhöhung der Molekular-Gewichte der Translations-Produkte auf. Diese Effekte könnten sich mit einer Änderung der Sekundär-Struktur der m-RNS durch variierende Ionen-Konzentrationen (2) begründen lassen. Wegen der Sekundär-Struktur könnten unter nicht-optimalen Bedingungen nur ganz bestimmte Abschnitte der m-RNS translatiert werden. Nach einer von Tse und Taylor (47) vertretenen Ansicht ist bei niedrigen Kalium und Magnesium-Konzentrationen die Stabilität des Protein-synthetisierenden Komplexes reduziert; die Translation der messenger RNS wird vorzeitig beendet, weil sich Peptidyl-t-RNS aus dem Komplex ablöst. Durch SDS-Gelelektrophorese der Translations-Produkte von m-RNS aus Hunde-Pankreas konnten unter optimalen Translations-Bedingungen vorwiegend Moleküle im Bereich zwischen 6.000 und 50.000 D nachgewiesen werden. Auf präterminalen Kettenabbruch im zell-freien System finden sich auch in der Literatur zahlreiche Hinweise (27,29,48-52). Das Translations-System inkorporiert bei 25°C etwa 60 Minuten Aminosäuren in TCA-fällbares Material. Die Beendigung der

Synthese nach diesem Zeitraum könnte auf system-immanente Ribonucleasen zurückzuführen sein. Inkubiert man nämlich eine ^{3}H-Uridin markierte 28 S RNS aus Ascites-Tumorzellen zwei Stunden in einem mit Hunde-Pankreas m-RNS programmierten Translations-Ansatz (mit nicht-radioaktivem Leucin) und vergleicht die Sedimentations-Profile vor und nach Inkubation im Sucrose-Gradienten, so findet man, daß starke Fragmentierung stattgefunden hat (Daten werden nicht gezeigt).
Es gelang, insulin-immunoreaktives Material als Translations-Produkt von Hunde-Pankreas m-RNS mit S-Werten von 8 bis 9 nachzuweisen. Nimmt man als durchschnittliches Molekular-Gewicht für ein Nucleotid 300 D an (33), lassen sich die gefundenen S-Werte nach (34) in Nucleotide umrechnen. Dabei findet man für 8 S 480 Nucleotide und für 9 S 610 Nucleotide. Die m-RNS für Präproinsulin erweist sich damit als wesentlich größer, als die zur Codierung eines Proteins vom Molekular-Gewicht 12.000 D erforderlichen etwa 360 Nucleotide (3.4.4.). Es waren stets weniger als 0.1% der Translations-Produkte von m-RNS mit diesen S-Werten insulin-immunoreaktiv. Dies erlaubt aber keinen unmittelbaren Rückschluß auf den Anreicherungsgrad der m-RNS für Präproinsulin, denn nach neueren Befunden wird m-RNS von Präproinsulin (aus foetalem Rinder-Pankreas) im Weizenkeim-System unter optimalen Translations-Bedingungen sehr schlecht initiiert (2). Lomedico und Saunders (1) berichteten über insulin-immunoreaktive Translations-Produkte mit 6-9 S m-RNS aus Hunde-Pankreas. Sie extrahierten zunächst die Gesamt-Nucleinsäuren und trennten daraus die m-RNS ab. Bei den hier beschriebenen Experimenten wurden zunächst Polysomen isoliert und daraus die m-RNS gewonnen.

Zur eventuellen Isolierung der m-RNS für Präproinsulin wurde ein Experiment angestellt, über das im Ergebnis-Teil nicht berichtet wurde. Das C-Peptid von Hunde-Proinsulin enthält Glycin-Reste in den Positionen 14,17,19 und 20 (24). Der genetische Code für Glycin (53)

ist GGU, GGC, GGA oder GGG. Auf der entsprechenden m-RNS erwartet man deshalb mindestens acht relativ kumulierte Guanin-Reste. Deshalb wurde Poly C an BrCN-aktivierte Sepharose immobilisiert und die Gesamt m-RNS aus Hunde-Pankreas an diesem Material chromatographiert. Die experimentellen Bedingungen waren dieselben wie bei der Oligo-dT-Cellulose Chromatographie. In einem Kontroll-Versuch wurde bestätigt, daß Poly-Inosin gebunden wird. Nach intensivem Waschen der Säulen konnte stets translatierbares Material eluiert werden. Die Translations-Produkte waren aber nie insulin-immunoreaktiv.

Der Prä-Anteil von Präproinsulin und anderer sekretorischer Proteine ist besonders reich an hydrophoben Aminosäuren (3,4,54). Unter ihnen ist Leucin am häufigsten vertreten. Der genetische Code für Leucin ist UUA, UUG, CUU, CUC, CUA oder CUG (53). Bei günstiger Utilisation der Code-Wörter müßte der für den Prä-Anteil codierende Teil der Präproinsulin m-RNS reich an kumulierten Uracil-Resten sein. Gesamt m-RNS aus Hunde-Pankreas wurde deshalb wie oben beschrieben an Poly A Sepharose chromatographiert (Poly U wird unter diesen Bedingungen gebunden). In keinem Fall konnte m-RNS mit Affinität zu Poly A-Sepharose nachgewiesen werden.

Unter den Translations-Produkten von m-RNS aus Pentasomen und Hexasomen konnte insulin-immunoreaktives Material gelelektrophoretisch identifiziert werden. Nimmt man an, daß die m-RNS Länge, die von einem Ribosom abgelesen wird, ca. 90 Nucleotide beträgt (55), ergibt sich für die m-RNS von Präproinsulin eine Länge von 450 bis 540 Nucleotiden, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Sucrose-Gradienten-Zentrifugation von Hunde-Pankreas m-RNS steht. Auch andere Polyribosomen-Klassen aus Hunde-Pankreas scheinen m-RNS Moleküle zu enthalten, die insulin-immunoreaktives Material codieren. Leider waren hier

zu wenige Ipm unter den Translations-Produkten insulin-immunoreaktiv, um eindeutige Aussagen machen zu können. Tjioe und Kroon (41) pelletierten Polyribosomen-Fraktionen aus Langerhansschen Inseln der Ratte, setzten die wieder gelösten Ribosomen in einen Immuntest ein und fanden vor allem Trisomen mit Proinsulin-Molekülen assoziiert. Das Sedimentations-Profil ihrer Polyribosomen-Präparation weist jedoch auf starke Abbau-Effekte hin. Hew und Yip (40), die Polyribosomen aus foetalem Rinder-Pankreas bei Gegenwart von Antikörpern gegen Ribonuclease A isolierten und Sedimentations-Profile erhielten, die auf die Intaktheit der Polysomen schließen lassen, fanden durch Radioimmuno-Assay der Polyribosomen-Fraktionen insulin-immunoreaktives Material vor allem auf Tetrasomen, Pentasomen und höheren Polyribosomen.

Eine Reinigung der m-RNS für Präproinsulin durch Immunoreaktion von Polysomen aus Hunde-Pankreas mit immobilisierten Antikörpern gegen Rinder-Insulin gelang nicht. Die Bindungsfähigkeit der immobilisierten Antikörper gegenüber ^{125}I-Insulin wurde in Kontroll-Versuchen bestätigt. Die Bindungsstellen der Antikörper für das Antigen bleiben also nach der Immobilisierung funktionell intakt. Lomedico et al (3) zeigten, daß die Bindungsfähigkeit von Translations-Produkten mit m-RNS aus foetalem Rinder-Pankreas durch Behandlung mit Jodacetamid und Maleinimid wesentlich beeinträchtigt wird. Auf den isolierten Polysomen aus Hunde-Pankreas haften wahrscheinlich viele Proinsulin-Moleküle, deren Synthese noch nicht abgeschlossen ist. Das bedeutet aber, daß die Disulfid-Brücken noch nicht ausgebildet sind und damit die für eine effiziente Bindung an Insulin-Antiserum erforderliche Tertiärstruktur noch nicht etabliert ist. Die fertigen Proinsulin-Moleküle werden aber nach der Synthese vom Ribosom abgelöst und in die Cisternen des endoplasmatischen Retikulums

transportiert, von wo aus sie zum Golgi-Apparat wandern (56). Da über die Verweilzeit von komplettierten Proinsulin-Molekülen auf dem Ribosom nichts bekannt ist, besteht durchaus die Möglichkeit, daß nur sehr wenige Polysomen mit korrekt gefalteten Proinsulin-Molekülen vorhanden sind und damit gebunden werden. Da etwa 1% der applizierten EU^{260} trotz intensivsten Waschens unspezifisch von den Affinitäts-Säulen gebunden wird, wären dann die komplettierte Proinsulin-Moleküle tragenden Polysomen trotz Immunoreaktion nur äußerst schwach angereichert und Präproinsulin unter den Translations-Produkten von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu Antikörper-Insulin-Sepharose mit den beschriebenen Methoden nicht nachweisbar.

Andererseits ist es auch möglich, daß eine Immunoreaktion zwischen Rinder-Insulin-Antikörpern und Hunde-Pankreas-Polysomen gar nicht stattfindet. Nach neueren Vorstellungen (39) wird die m-RNS durch einen Tunnel zwischen beiden ribosomalen Untereinheiten hindurchgeführt. Es ist möglich, daß die antigenen Determinanten der nascierenden Proinsulin-Ketten durch das umgebende Ribosom abgeschirmt sind und von den Insulin-Antikörpern nicht erkannt werden können. Bei noch nicht komplettierten Proinsulin-Molekülen sind die antigenen Determinanten entweder nicht existent oder nicht zugänglich.

Durch Verwendung von Antikörpern gegen Rinder-Proinsulin sollte eine zusätzliche antigene Determinante (auf dem C-Peptid gelegen) erfaßt werden können. Aber auch damit gelang es nicht, nach Proinsulin-Moleküle tragenden Polysomen zu selektieren. Da das C-Peptid von Hunde-Proinsulin eine Deletion von acht Aminosäuren aufweist und noch weitere Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz bestehen (24), ist es zweifelhaft, ob die beiden C-Peptide überhaupt identische antigene Determinanten haben.

Es wurde darüber berichtet, daß sich die Translations-Produkte

von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu den Antikörper beladenen Säulen von denen mit m-RNS aus Polysomen ohne Affinität unterscheiden. Eine rein unspezifische Bindung gilt nach den Versuchs-Ergebnissen als unwahrscheinlich. Eine Bindung von Proinsulin-Ketten tragenden Polysomen scheidet aber aus, da die Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität nicht insulin-immunoreaktiv sind. Eine mögliche Erklärung für dieses Verhalten wäre, daß es Moleküle auf den Polysomen gibt, die identische oder ähnliche antigene Determinanten wie das Insulin besitzen und deshalb von den Antikörpern gebunden werden.
Die hier beschriebenen Experimente können als Modellversuche für die Lösung anderer Fragestellungen betrachtet werden. Glucagon und Somatostatin sind neben dem Insulin weitere Synthese-Produkte des endokrinen pankreatischen Anteils, bei denen ein ähnlich schwacher Anreicherungs-Zustand wie beim Insulin vorliegen dürfte. Über die Biosynthese dieser Hormone auf der hier untersuchten Ebene ist bisher noch nichts publiziert worden. Da man sowohl gegen Glucagon, als auch gegen Somatostatin (57-59) Antikörper induzieren kann, müßte es möglich sein, ihre bei der zell-freien Translation pankreatischer m-RNS gebildeten Vorstufen mit einem analogen doppelten Antikörper-Test, wie hier für Präproinsulin beschrieben, zu identifizieren. Somatostatin der Ratte besitzt nur 14 Aminosäuren (60,61). Liefe der Biosynthese-Mechanismus ähnlich ab wie beim Insulin (Vorläufer hat doppeltes Molekular-Gewicht), hätte die zugehörige m-RNS einen S-Wert der sicher nicht größer als sechs wäre. Ein S-Wert von sechs entspricht nach (34) etwa 250 Nucleotiden. Wie die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen, gibt es in diesem Bereich nur sehr wenige m-RNS Spezies. Die m-RNS für die Vorstufe von Somatostatin könnte deshalb durch Sucrose-Gradienten-Zentrifugation eventuell beträchtlich angereichert werden. Das wäre die Voraussetzung für eine Reaktion mit reverser Transkriptase und damit für die Synthese des Gens für Somatostatin.

5. ZUSAMMENFASSUNG.

1) Spezies-verschiedene Nucleinsäure-Präparationen wurden im Sucrose-Gradienten auf Fragmentierung untersucht und diese in Korrelation zum Ribonuclease-Gehalt der Gewebe gesetzt.
2) Die Isolierung und Charakterisierung von funktionell intakten Polysomen aus Hunde-Pankreas wird beschrieben. Diese Behauptung wird durch Modell-Untersuchungen belegt.
3) Messenger RNS aus Hunde-Pankreas wird isoliert und ihre Translatierbarkeit in einem zell-freien System nach verschiedenen Parametern optimiert.
4) Gelelektrophoretische Untersuchungen belegen die Abhängigkeit der Molekulargewichts-Verteilung der Translations-Produkte von der Kalium- und Magnesium-Konzentration.
5) Messenger RNS aus Hunde-Pankreas wird im Sucrose-Gradienten untersucht, zell-frei übersetzt und unter den Translations-Produkten von 8-9 S eine insulin-immunoreaktive Komponente von MG 11.000 - 12.000 D nachgewiesen.
6) Aus Polyribosomen verschiedener Größe wird m-RNS isoliert, zell-frei übersetzt und unter den Translations-Produkten von Penta- und Hexasomen insulin-immunoreaktives Material gefunden.
7) Im Hinblick auf eine eventuelle Isolierung der m-RNS für Präproinsulin wurde die Immunoreaktion zwischen Hunde-Pankreas-Polysomen und immobilisierten Antikörpern gegen Rinder-Insulin und Rinder-Proinsulin untersucht. Die Translations-Produkte von m-RNS aus Polysomen mit Affinität zu den Antikörpern wurden auf Insulin-Immunoreaktivität geprüft und ihre Molekulargewichts-Verteilung bestimmt.

6. LITERATURVERZEICHNIS.

1) Lomedico, P.T. und Saunders, G.F., (1976) Nucleic Acids Res. 3, 381-391
2) Lomedico, P.T. und Saunders, G.F., (1978) Science 198, 620-622
3) Lomedico, P.T., Chan, S.J., Steiner, D.F., Saunders, G.F., (1977), J. Biol. Chem. 252, 7971-7978
4) Chan, S.J., Keim, P., Steiner, D.F., (1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1964 - 1968
5) Duguid, J.R., Steiner, D.F., Chick, W.L.,(1976), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3539-3543
6) Itoh, N. und Ikamoto, H.,(1977), FEBS Lett. 80, 111-114
7) Shields, D. und Blobel, G., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2059-2063
8) Permutt, M.A., Boime, I., Chyn, R., Goldford, M., (1978), Biochemistry 17, 537-543
9) Rapoport, T.A., Höhne, W.E., Klatt, D., Prehn, S., Hahn, V., (1976), FEBS Lett. 69, 32-36
10) Rapoport, T.A., Thiele, B.J., Prehn, S., Marbaix, G., Cleuter, Y., Hubert, E., Huez, G.,(1978), Eur. J. Biochem. 87, 229-233
11) Barnard, E.A., (1969), Nature 221, 340-344
12) Aviv, H. und Leder, P., (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 69, 1408-1412
13) Roberts, B.E., Paterson, B.M., (1973), Proc. Natl. Acad. of Sci. 70,2330-2334
14) Marcu, K. und Dudock, B. , (1974), Nucleic Acids Res. 1, 1385-1397
15) Beato, M. und Rungger, D., (1975), FEBS Lett. 59, 305-310
16) Beato, M. und Nieto, A. (1976), Europ. J. of Biochem. 64, 15-25

17) Pemberton, R.E., Liberti, P., Baglioni, C., (1975), Anal. Biochem. 66, 18-28
18) Krystosek, A., Cawthon, M.L., Kabat, D., (1975), J. Biol. Chem. 250, 6077-6084
19) Laemmli, U.K., Nature 227, 680-685 (1970).
20) Weber, K., Osborn, M., (1969), J. Biol. Chem. 244, 4406-4412
21) Chase, M.W., (1967), in Meth. in Immunol. and Immunochem., Williams, C.A. and Chase, M.W. eds., Academic Press, New York, pp. 197-271 und 319
22) Palacios, R., Sullivan, D., Summers, M., Kiely, M.L. und Schimke, R.T., (1973), J. Biol. Chem. 248, 540-548
23) Broschüre Affinitäts-Chromatographie (Pharmacia)
24) Kemmler, W., Peterson, J., Rubenstein, A.H., Steiner, D.F., (1972), Diabetes 21 (Suppl.), 572-581
25) Zahn, H., (1972), Diabetes 21,(Suppl.2), 457-460
26) Strauss, A.W., Donohue, A.M., Bennett, C.D., Rodkey, J.A., Alberts, A.W., (1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 1358-1362
27) Kemper, B., Habener, J.F., Potts, J.T., Rich A., (1976), Biochemistry 15, 20-25
28) Burstein, Y. und Schechter, I.,(1977), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 716-720
29) Devillers-Thiery, A., Kindt, T., Scheele, G. und Blobel, G., (1975), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 5016-5020
30) Maurer, R.A., Gorski, J. und Mc Kean, D.J., (1977), Biochem. J. 161, 189-192
31) Brawerman, G., (1974), Ann. Rev. Biochem. 43, 621-642
32) Harbers, E., Nucleinsäuren, Thieme Verlag Stuttgart (1975), p. 186

33) Hofstaetter, Th., Dissertation, Universität Tübingen, Fachbereich Chemie (1975), p. 20
34) Arnstein, H.R.V., Cox, R.A., (1966), Brit. Med. Bull. 22, 158
35) Schutz, G., Kieval, Sh., Groner, B., Sippel, A.E., Kurtz, D.T. und Feigelson, Ph., (1977), Nucleic Acids Res. 4, 71-84
36) Schimke, R.T., Palacios, R., Sullivan, D., Kiely, M.L., Gonzales, C., Taylor, J.M., (1973), in Methods in Enzymology, eds, Moldave, K. und Grossman, L. (Academic Press, New York) 30, 631-648
37) Yip, C.C. und Logothetopoulos, (1968), Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 62, 415-419
38) Rubenstein, A.H., Porter, W., Mako, M., Melani, F. und Steiner, D.F., (1970), Diabetes 19, 546-553
39) Nonomura, Y., Blobel, G. und Sabatini, D., (1971), J. Mol. Biol. 60, 303
40) Hew, Ch.L. und Yip, C.C., (1974), Can. J. Biochem, 52, 959-965
41) Tjioe, T.O. und Kroon, A.M., (1973), FEBS Lett. 33, 225-228
42) Diekman, S.R. und Bruenger, E., (1965), Biochemistry 4, 2335-2339
43) Rowley, P.T. und Morris, J., (1966), Exp. Cell Res. 45, 494-497
44) Blobel, G. und Potter, V.R., (1967), J. Mol. Biol. 28, 539-542
45) Blobel, G. und Potter, V.R., (1967). J. Mol. Biol. 26, 279-292
46) Permutt, M.A. und Kipnis, D.M., (1972), Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 69, 505-509
47) Tse, T.P.H. und Taylor, J.M., (1977), J. of Biol. Chem. 252, 1272-1278

48) Beneviste, K., Wilczek, J., Ruggieri, A. und Stern R., (1976), Biochemistry 15, 830-835
49) Kemper, B., Habener, J.F., Mulligan, R.C., Potts, J.T. und Rich, A., (1974), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3731-3735
50) Rosen, J.M., (1976), Biochemistry 15, 5263-5271
51) Mathews, M.B. und Osborn, M., (1974), Biochim. Biophys. Acta 340, 147-152
52) Davies, J.W. und Kaesberg,P., (1974), J. Gen. Virol. 25, 11-20
53) Träger, L., (1975), Einführung in die Molekular-Biologie, 2. Auflage, p. 86, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
54) Devillers-Thiery, A., Kindt, T., Scheele, G. und Blobel, G., (1975), Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 72, 5016-5020
55) Siehe Referenz 53, p. 140
56) Steiner, D.F., Kemmler, W., Tager, H.S. und Peterson, J.D., (1974), Fed. Proc. 33, 2105-2115
57) Hökfelt, T., Elfvin, L.G., Elde, R., Schultzberg, M., Goldstein, M., Luft, R., (1977), Proc. Natl. Acad. of Sci. U.S.A. 74, 3587-3591
58) Laburthe, M., Rançon, F., Freychet, P., Rosselin, G., (1975), Diabetologia 11, 517-526
59) Unger, R.H., Eisentraut, A.M., Mc Call, M.S., Keller, S., Lanz, H.C., (1959), Proc. Soc. exp. Biol. 102, 621
60) Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., Guillemin, R., (1973), Science 179, 77 - 79
61) Luft, R., Efendić, S. und Hökfelt, T., (1978), Diabetologia 14, 1-13.

Lebenslauf.

Ich wurde am 12.1.49 als erster Sohn der Eheleute Ulrich und Anneliese Weidle in Ittelsburg (Bayern) geboren. Ab September 1956 besuchte ich sieben Jahre lang die Volksschule in Ittelsburg. 1963 trat ich in die Städt. Mittelschule in Memmingen ein, die ich 1965 mit der "Mittleren Reife" abschloß. Anschließend wechselte ich in den math. nat. Zweig des Bernhard-Striegel Gymnasiums in Memmingen über, wo ich im Juli 1969 das Abitur ablegte. Im Winter-Semester 69/70 begann ich das Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Universität Tübingen. Den ersten Teil des Vordiploms legte ich nach dem Sommer-Semester 70, den zweiten Teil nach dem Winter-Semester 72 ab. Den mündlichen Teil meiner Diplom-Hauptprüfung schloß ich nach dem Sommer-Semester 74 ab. Anschließend arbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. H.Probst an meiner Diplom-Arbeit, welche ich im August 75 abschloß. Von Mai 76 bis Juni 78 arbeitete ich am experimentellen Teil meiner Dissertation unter Anleitung von Prof. U.Weber im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie:	G.Weitzel, U.Weser, H.Probst, U.Weber
Physikalische Chemie:	H.Mauser
Physikalische Biochemie:	K. Wegmann
Organische Chemie:	E.Müller, E.Bayer
Theoretische Chemie:	F.F.Seelig
Anorganische Chemie:	W.Rüdorff
Pharmakologie:	H.Remmer
Mikrobiologie:	H.Zähner
Physik:	H.Krüger
Mathematik:	W.Schweizer
Anatomie:	K.Mörike
Zoologie:	K.G.Grell
Botanik:	H.Metzner
Physiologie:	E.Betz